



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y FUNCIONALES DE LAS CÉLULAS
MESENQUIMALES MULTIPOTENCIALES DEL ESTROMA DE MÉDULA ÓSEA EN LA
ESCLEROSIS MÚLTIPLE. EFECTO EN LA ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE
EXPERIMENTAL E IMPLICACIÓN DEL SISTEMA CANNABINOIDE**

TESIS DOCTORAL

LAURA ROMÁN VEGA

MADRID, 2016

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



**CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y FUNCIONALES DE LAS CÉLULAS
MESENQUIMALES MULTIPOTENCIALES DEL ESTROMA DE MÉDULA ÓSEA EN LA
ESCLEROSIS MÚLTIPLE. EFECTO EN LA ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE
EXPERIMENTAL E IMPLICACIÓN DEL SISTEMA CANNABINOIDE**

TESIS DOCTORAL

LAURA ROMÁN VEGA

LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

DIRECTORES: **DR. JUAN ANTONIO GARCÍA MERINO**

DR. ANTONIO JOSÉ SANCHÉZ LÓPEZ

LABORATORIO DE NEUROINMUNOLOGÍA

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA PUERTA DE
HIERRO

MADRID, 2016

INFORME

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica, inflamatoria y neurodegenerativa, mediada por el sistema inmune que se caracteriza por la presencia de inflamación, desmielinización y daño axonal en el sistema nervioso central (SNC). Debido a que los tratamientos actuales en EM, son parcialmente efectivos por carencia de mecanismos de remielinización y regeneración, aparecen las terapias celulares con células madre mesenquimales (CMM) con un importante potencial de neuroprotección y reparación. Los resultados obtenidos en estudios *in vivo* en el modelo murino de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), han justificado varios ensayos clínicos para explorar el uso de CMM autólogas en EM. Sin embargo, aun existe controversia en cuanto a si las CMM de pacientes de EM presentan las mismas características fenotípicas y funcionales que las de controles sanos, y nunca se ha probado el potencial terapéutico en EAE de las CMM de pacientes de EM *in vivo*. Por otra parte, se ha observado que el sistema endocannabinoide (SEC) desempeña un papel importante en la regulación de la respuesta inmune en el SNC. Varios estudios experimentales en EAE, han demostrado que los cannabinoides presentan propiedades inmunorreguladoras, neuroprotectoras y remielinizadoras; sin embargo, la información que aporta la literatura sobre la expresión del SEC en las CMM humanas, es escasa y no concluyente; asimismo, no existen estudios con CMM de pacientes de EM. En este trabajo hemos analizado las características fenotípicas y funcionales de las CMM de controles sin enfermedad autoinmune, y pacientes de EM. También, hemos estudiado el SEC en dichas células y evaluado el efecto de los cannabinoides *in vitro*. Para lograr los objetivos, se obtuvieron CMM de médula ósea de pacientes y de controles, se caracterizaron por citometría de flujo y se expandieron para valorar su capacidad de transformación en líneas adiposa, cartilaginosa y ósea. Además, se analizó su capacidad antiproliferativa sobre células T estimuladas, se midió su efecto sobre la producción de citoquinas Th1 y Th2; y se valoró la producción del factor neurotrófico NGF, en cultivo. Por otra parte, se valoró la potencia supresora de las CMM de controles y pacientes en el modelo murino de EAE, tanto clínica como histológicamente. Finalmente, se caracterizaron los receptores de cannabinoides CB₁ y CB₂ en las CMM de controles y pacientes; y se analizó la respuesta *in vitro* de las CMM al tratamiento con cannabinoides endógenos y exógenos. En nuestros resultados observamos características fenotípicas y funcionales, *in vitro*, similares en las CMM de pacientes de EM y sujetos control. Por primera vez, se demuestra que las CMM de pacientes de EM disminuyen la EAE, reduciendo los signos clínicos y los aspectos histológicos más relevantes (inflamación, desmielinización y daño axonal), del mismo modo que las CMM de controles. Además, detectamos la presencia del SEC en las CMM de controles y pacientes de EM y mostramos que el tratamiento de las CMM con diferentes cannabinoides, no modifica su respuesta *in vitro*. Esta investigación aporta datos que apoyan el uso de CMM autólogas en el tratamiento de la EM, y aporta información

hasta ahora desconocida sobre el SEC y el efecto del tratamiento con cannabinoides en las CMM de controles y pacientes de EM.

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is a chronic disorder mediated by the immune system characterized by the presence of inflammation, demyelination and axonal damage in the central nervous system (CNS). Current therapy for MS is partially effective as it has no effect on remyelination and regeneration mechanisms. Stem cell therapies with mesenchymal stem cells (MSC) have significant potential for neuroprotection and regeneration. The results obtained in vivo studies, in the mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), have justified several clinical trials to explore the use of autologous MSC in MS. However, there is still controversy about whether the CMM of MS patients have the same phenotypic and functional characteristics of healthy controls; and it has never been tested their therapeutic potential in EAE. Moreover, it has been observed that the endocannabinoid system (ECS) plays an important role in regulating the immune response in the CNS. Experimental studies in EAE, have shown that cannabinoids have immunoregulatory, neuroprotective and remyelination properties; however, the information provided by the literature on the expression of the ECS in human MSC, is scarce and inconclusive. Also, there are no studies of MS patients MSC. In this study, we analyzed the phenotypic and functional characteristics of the MSC without autoimmune disease controls and MS patients. We have also studied the ECS in these cells and evaluated the in vitro effect of cannabinoids. To achieve the objectives, MSC of patients and controls were isolated, characterized by flow cytometry and expanded to assess their ability to transform into fat, cartilage and bone lines. Moreover, their antiproliferative capacity on stimulated T cells was analyzed, its effect on the production of Th1 and Th2 cytokines were measured; and NGF neurotrophic factor production in culture was assessed. Moreover, the suppressive capacity of the CMM controls and patients in the mouse model of EAE, both clinically and histologically assessed. Finally, the CB₁ and CB₂ receptors were characterized in the MSC controls and patients; and the in vitro response of the MSC to treatment with exogenous and endogenous cannabinoid was analyzed. We have observed phenotypic and functional characteristics, in vitro, similar to the MSC of MS patients and control subjects. For the first time, we demonstrated that MSC from MS patients improves EAE, reducing clinical signs and the most relevant histological aspects (inflammation, demyelination and axonal damage), just as the MSC controls. In addition, we detected the presence of the ECS in the MSC controls and MS patients and showed that treatment of MSC with different cannabinoids; modify its response in vitro. This study provides data to support the use of autologous MSC in the treatment of MS, and provides information about the ECS and the effect of treatment with cannabinoids in the MSC controls and MS patients.

ÍNDICE

1. ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1 ESCLEROSIS MÚLTIPLE.....	2
2.2 ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL	7
2.3 CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES	9
2.4 CANNABINOIDES	14
3. OBJETIVOS	15
3.1 OBJETIVO GENERAL	15
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
4. MATERIAL Y MÉTODOS	21
4.1 SELECCIÓN DE CONTROLES Y PACIENTES	21
4.2 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA DE MÉDULA ÓSEA	21
4.3 CULTIVO PRIMARIO DE CMM	22
4.4 OBTENCIÓN Y CULTIVO DE CMN DE BAZO Y GANGLIO DE RATONES EAE: CÉLULAS ENCEFALITÓGENAS DE RATÓN	23
4.5 OBTENCIÓN Y CULTIVO DE PBMC.....	24
4.6 EVALUACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO DE CMM.....	24
4.7 DIFERENCIACIÓN TRILINEAR DE CMM.....	24
4.8 ENSAYO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC)	26
4.9 ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN	26
4.10 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE FACTORES NEUROTROFICOS E INTERLEUQUINAS (ELISA)	27
4.11 INDUCCIÓN ACTIVA DE LA EAE	27
4.12 HISTOLOGÍA.....	29
4.13 INMUNOFUORESCENCIA.....	29
4.14 TINCIÓN HEMATOXILINA Y EOSINA	30
4.15 CITOMETRÍA DE FLUJO	31

4.16	PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL.....	32
4.17	TRATAMIENTOS CON CANNABINOIDES ENDÓGENOS Y EXÓGENOS.....	33
4.18	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	33
5.	RESULTADOS.....	34
5.1	OBTENCIÓN DE CMM DE MO DE CONTROLES Y PACIENTES DE EM	34
5.2	CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA, CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE COLONIAS (UFC) Y TRANSFORMACIÓN TRILINEAR DE LAS CMM	35
5.3	VALORACIÓN DE LA CAPACIDAD INMUNOMODULADORA Y LA PRODUCCIÓN DE FACTORES NEUOTRÓFICOS DE LAS CMM DE CONTROLES Y PACIENTES.....	40
5.4	EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON CMM DE CONTROLES Y PACIENTES DE EM EN EAE	45
5.5	CARACTERIZACIÓN DE LOS RECEPTORES CB ₁ Y CB ₂ EN LAS CMM Y DE SU RESPUESTA FRENTE A CANNABINOIDES ENDÓGENOS Y EXÓGENOS	57
6.	DISCUSIÓN.....	71
7.	CONCLUSIONES.....	82
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	83

1. ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

1. ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

EM: Esclerosis Múltiple

SNC: Sistema Nervioso Central

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad (Major Histocompatibility Complex)

MBP: Proteína Mielínica Básica (Myelin Basic Protein)

MOG: Glicoproteína Mielínica de Oligodendrocitos (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein)

PLP: Proteína Proteolípida (Proteolipid Protein)

SNP: Sistema Nervioso Periférico

CMM: Células Madre Mesenquimales

EAE: Encefalomiелitis Autoinmune experimental (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis)

RR: Esclerosis Múltiple Remitente Recurrente

SP: Esclerosis Múltiple Secundariamente Progresiva

PP: Esclerosis Múltiple Primariamente Progresiva

PR: Esclerosis Múltiple Progresiva Recurrente

TCR: Receptor de la Célula T (T Cell Receptor)

BHE: Barrera Hematoencefálica

IFN: Interferón

TNF: Factor de Necrosis Tumoral (Tumor Necrosis Factor)

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNm: Ácido Ribonucleico Mensajero

GA: Acetato de Glatirámero (Glatiramer Acetate)

LCR: Líquido Ceforraquídeo

LT: Linfotoxinas

IL: Interleuquina

NO: Óxido Nítrico (Nitric Oxide)

Treg: Células T Reguladoras

NK: Células Citotóxicas Naturales (Natural Killer Cells)

IDO: Indoleamina Dioxigenasa (Indoleamine-Deoxygenase)

TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante Beta β (Transforming-Growth Factor β)

PGE2: Prostaglandina E2

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

TLR: Receptores Tipo Toll (Toll-Like Receptors)

i.v: Vía Intravenosa

i.p: Vía Intraperitoneal

i.cv: Vía Intracerebroventricular

i.t: Vía Intratecal

Δ 9-THC: Δ 9 Tetrahidrocannabidiol

CB₁: Receptor de Cannabinoides 1 (Cannabinoid Receptor Type 1)

CB₂: Receptor de Cannabinoides 2 (Cannabinoid Receptor Type 2)

CBD: Cannabidiol

PPAR: Receptor Activado por Proliferadores Peroxisomales (Peroxisome Proliferator Activated Receptor)

GPR55: Receptor Acoplado a Proteína G 55 (G Protein Coupled Receptor 55)

SEC: Sistema Endocannabinoide

eCBs: Endocannabinoides

AEA: N-Araquidonil-Etanolamida o Anandamida

2-AG: 2-Araquidonilglicerol

FAAH: Amidohidrolasa de Ácidos Grasos (Fatty Acid Amide Hydrolase)

WIN: WIN55,212-2

GMP: Buenas Prácticas de Fabricación (Good Manufacturing Practice)

SAFC: Suero Fetal Bovino Australiano (Serum Australian Fetal Calf)

EDTA: Ácido Etildiaminotetraacético (Ethylenediaminetetraacetic Acid)

PBS: Buffer Fosfato Salino (Phosphate Buffered Saline)

HBSS: Solución Salina Equilibrada de Hank (Hanks' Balanced Salt Solution)

ACK: Tampón de Lisis Amoníaco-Cloruro-Potasio (Ammonium-Chloride-Potassium Lysing Buffer)

DMEM: Medio Eagle Modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

SBF: Suero Fetal Bovino (Serum Bovine Fetal)

PBMC: Células Mononucleares de Sangre Periférica (Peripheral Blood Mononuclear Cells)

DMSO: Dimetilsulfóxido (Dimethyl Sulfoxide)

BSA: Albumina de Suero Bovino (Bovine Serum Albumin)

HA: Hidroxiapatita Inorgánica

MTT: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5- Difenil Bromuro de Tetrazolio ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Dipheniltetrazolium Bromide))

ELISA: Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

NGF: Factor de Crecimiento Nervioso (Nerve Growth Factor)

CFA: Adyuvante Completo de Freund (Complete Freund's Adjuvant)

IFA: Adyuvante Incompleto de Freund (Incomplete Freund's Adjuvant)

DPI: Días Post Inmunización

TxP: Toxina Pertussis

O.C.T: Temperatura de Corte Óptima (Optimal Cutting Temperature)

UPL: Sondas Universal Probe Library

GAPDH: Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase)

SDHA: Complejo Succinato Deshidrogenasa, Subunidad A (Succinate Dehydrogenase Complex Subunit A)

EDSS: Escala Expandida del Estado de Discapacidad (Expanded Disability Status Scale)

ARR: Tasa Anualizada de Recaídas (Accounting Rate of Return)

IMF: Intensidad Media de Fluorescencia

CFSE: Éster Carboxifluoresceína Succinimidil (Carboxyfluorescein succinimidyl Ester)

PHA: Fitohemaglutinina (Phytohaemagglutinin)

2. INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1 ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La esclerosis múltiple (EM) es un trastorno crónico, inflamatorio y neurodegenerativo, mediado por el sistema inmune que se caracteriza por la presencia de inflamación, desmielinización y daño axonal en el sistema nervioso central (SNC) (Compston *et al* 2008). La EM fue descrita por primera vez en 1868 por Jean Martin Charcot, a partir del análisis patológico *post-mortem* de sus pacientes. Se trata de la principal causa de discapacidad neurológica entre gente joven en América del Norte y Europa (Noseworthy *et al* 2000) convirtiéndose en la principal causa de discapacidad en jóvenes adultos tras los traumatismos. Un 70% de los casos se inician entre los 20 y 40 años de edad, siendo la incidencia de dos a tres veces mayor en mujeres que en hombres. Los últimos estudios de epidemiología realizados en España han mostrado un aumento en los índices de prevalencia, alrededor de 100 casos/100.000 habitantes (Carreon-Guarnizo E *et al* 2016). En el norte de Europa, esta prevalencia es aún mayor con valores de 100-200 casos/100.000 habitantes (Compston *et al* 2008).

La causa de la EM es aún desconocida. Se considerada una enfermedad mediada por el sistema inmunitario que desencadena un ataque dirigido contra las vainas de mielina del SNC. Muchos estudios epidemiológicos sugieren que factores genéticos y medioambientales pueden tener un papel importante en la susceptibilidad a sufrir EM, sin descartar la acción de agentes infecciosos, probablemente infecciones virales (Noseworthy *et al* 2000; Frohman *et al* 2006).

Estudios epidemiológicos y demográficos describen la importancia de los factores genéticos en la iniciación y/o perpetuación de la EM. Aunque la asociación más fuerte y mejor caracterizada es la descrita para los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), existen otros genes como los del receptor de la célula T (TCR), citoquinas y sus receptores, receptores de la región constante de las inmunoglobulinas (FcR), quimioquinas y sus receptores o el gen de la apolipoproteína E (Apo-E) que también se han implicado en el desarrollo y la progresión de la enfermedad (Huang *et al* 2000; Arimilli *et al* 2000). La prevalencia de EM presenta una variación geográfica cuya causa no está muy clara, pero podría relacionarse, en parte, por la dotación genética característica de cada área geográfica.

La exposición a agentes infecciosos durante la infancia-adolescencia también se ha considerado como un factor de riesgo importante para el desarrollo de la enfermedad. Diferentes agentes patógenos como los retrovirus, herpesvirus fundamentalmente el virus Epstein-Barr, podrían ser un factor etiológico importante en la patogenia de la EM.

Hay datos que indicarían una influencia importante de las hormonas en la patogenia de esta enfermedad. La mayor afectación de las mujeres respecto a los hombres, se podría atribuir a diferencias en la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal entre sexos. Además,

se ha observado que durante el embarazo el número de brotes clínicos de la enfermedad está significativamente reducido, durante el puerperio aumenta el riesgo de presentar un brote clínico (Confavreux *et al* 1999). Por otro lado, existen evidencias experimentales de que el estrés también tiene un impacto importante en el curso de la enfermedad (Heneka *et al* 2001).

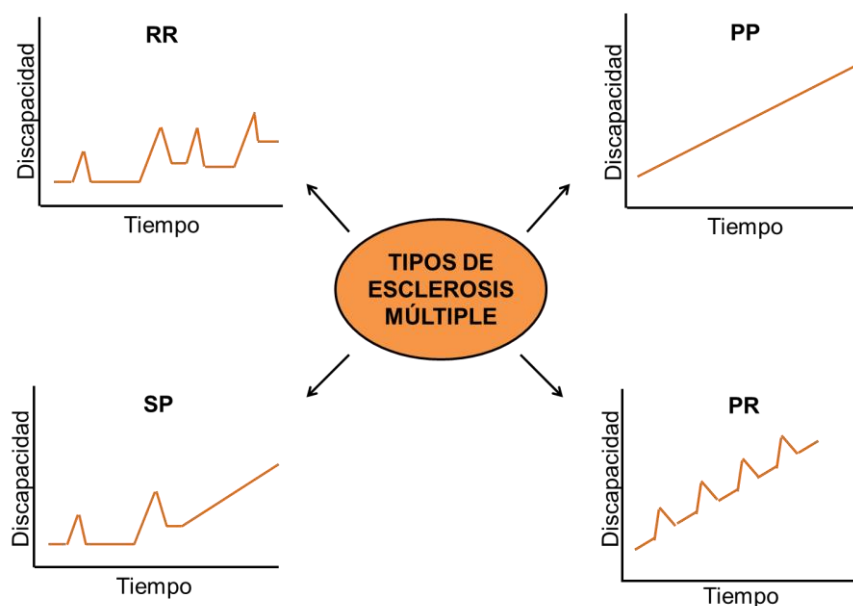
Finalmente, se ha presentado el potencial inmunológico como la principal diferencia entre pacientes con EM y la población sana. En este sentido, los pacientes con EM tienen una inmunorregulación deficiente lo que podría ser la responsable de la enfermedad (Huang *et al* 2001).

Numerosos antígenos candidatos se han implicado en la patogenia de la EM, pero no existen evidencias de que un único antígeno sea el responsable del desarrollo de la respuesta inmunitaria de la EM. De la estructura de la mielina derivan los principales antígenos que podrían inducir la respuesta autoinmune característica de la EM, destacando la proteína mielínica básica (MBP), la proteína proteolipídica (PLP) y la glicoproteína mielínica de los oligodendrocitos (MOG) además de estructuras no proteicas de la mielina como los gangliósidos (Sadatipour *et al* 1998). Sin embargo, se han descrito otros antígenos candidatos no relacionados con la mielina como la proteína astrogliar S100 (Kojima *et al* 1994) o la proteína de choque térmico B-cristalina (van Noort *et al* 1995).

La EM es una enfermedad heterogénea en la que los síntomas clínicos son muy variables. El paciente puede presentar cualquier síntoma de disfunción del SNC, y en casos excepcionales, también del sistema nervioso periférico (SNP). Los síntomas más comunes son: alteraciones de la sensibilidad (parestesia), deficiencias visuales causadas por neuritis óptica, temblor, fatiga, trastorno de los esfínteres, pérdida de la coordinación, debilidad muscular y espasticidad. Los signos clínicos vienen determinados por el lugar y la extensión de las lesiones (placas desmielinizantes) presentes en el SNC (Noseworthy *et al* 2000). Es una enfermedad que se caracteriza por la presencia de brotes clínicos (déficits neurológicos focales) como consecuencia de una lesión desmielinizante. Los brotes se clasifican según afecten a uno o varios sistemas en monofocales y polifocales.

Según el modo de inicio y la progresión de la enfermedad se han descrito distintos subgrupos clínicos (Lublin y Reingold 1996) que se recogen en el **esquema 1**. La mayoría de los pacientes (80%) desarrollan un curso clínico remitente-recurrente (RR) que se caracteriza por la aparición de brotes clínicos, que indican que un nuevo proceso inflamatorio está ocurriendo, separado por periodos de remisión parcial o total de los síntomas. Después de un periodo de tiempo variable, cerca de la mitad de estos pacientes, desarrollan una forma progresiva de la enfermedad no relacionada con brotes denominada secundariamente progresiva (SP). Existe un grupo pequeño de pacientes (10-15%) que desarrollan un curso progresivo de la enfermedad desde el inicio, sin la presencia de brotes clínicos, que recibe el nombre de primariamente progresiva (PP). Además, algunos autores, definen una cuarta forma clínica, con un curso progresivo recurrente (PR), que se caracteriza por un inicio progresivo, con presencia de brotes con o sin recuperación completa y

donde los períodos entre brotes se caracterizan por una progresión continua de los signos clínicos de la enfermedad.



Esquema 1: Tipos de EM según el modo de inicio y progresión de la enfermedad.

Es importante mencionar que en cuanto a la clasificación de los tipos de EM, actualmente existe un mayor conocimiento de la enfermedad y su patología; por lo que se ha propuesto una nueva clasificación de los fenotipos de EM ([Lublin 2014](#)) que correlaciona imágenes y biología, aproximándose mejor a la realidad clínica de la enfermedad. En este trabajo la clasificación se realiza en función de la actividad, bien clínica (brotes) o de neuroimagen (nuevas lesiones en resonancia magnética) y de la progresión, distinguiéndose dos categorías principales, formas con brotes y formas progresivas. Las primeras engloban el síndrome clínico aislado y la forma RR clásica y pueden ser activas o inactivas. Las formas progresivas incluyen aquellas que lo son desde el principio (EMPP) y las que lo son después de inicio recidivante (EMSP) y pueden asociarse a actividad y progresión, a actividad solamente, a progresión sin actividad, o ser inactivas sin progresión significativa.

La EM es una enfermedad inflamatoria y desmielinizante del SNC cuya neuropatología incluye degeneración axonal, pérdida de oligodendrocitos y la subsiguiente inducción de áreas desmielinizadas e hipocelulares bien delimitadas ([Frohman et al 2006](#)).

Las características patológicas de la enfermedad incluyen: inflamación perivascular mononuclear (linfocitos T, macrófagos/microglía), desmielinización acompañada de una pérdida variable de axones durante la fase crónica y grados variables de remielinización, daño relativo axonal y/o cicatrices glióticas con proliferación de astrocitos y producción de fibras gliales (astrogliosis) ([Trapp](#)

et al 1998). Las placas pueden desarrollarse en cualquier parte de la sustancia blanca siendo los nervios ópticos, el tronco cerebral, cerebelo y la médula espinal, las regiones más frecuentes.

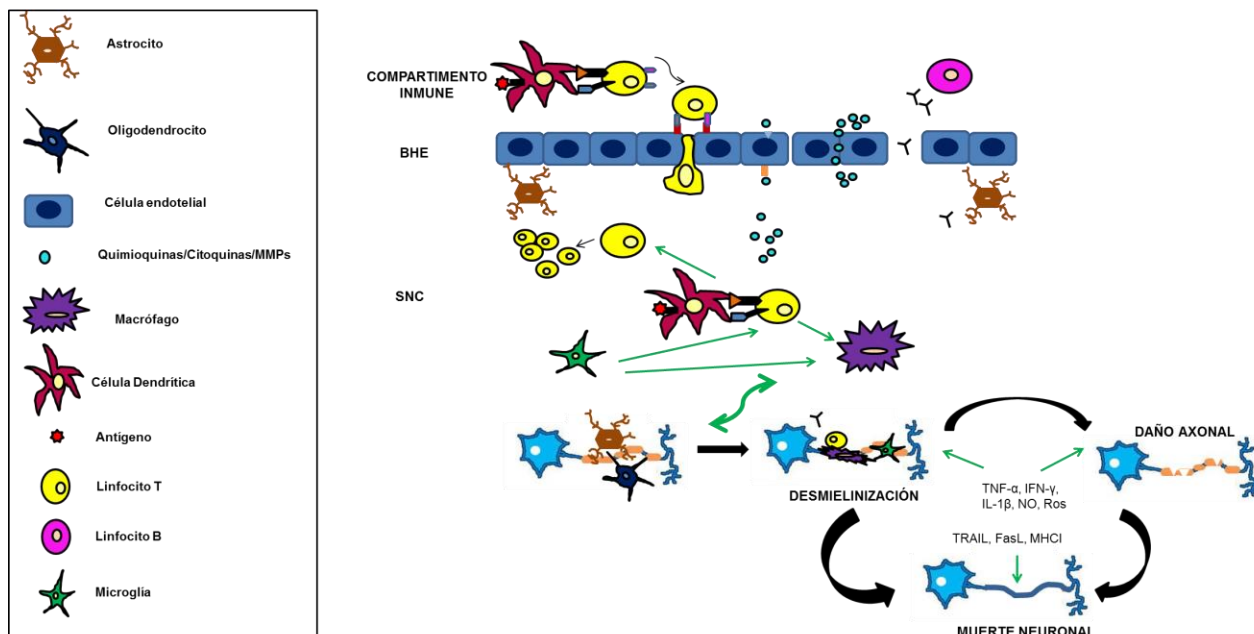
Si bien la EM es una entidad clínica bien descrita (*Shi et al 2014*), su etiología sigue siendo desconocida por lo que el estudio de la patogenia tiene un gran interés en la búsqueda de las causas de la enfermedad.

Los mecanismos patogénicos que se suceden en la EM se pueden dividir en:

- Activación de linfocitos T reactivos frente a componentes de la mielina;
- Infiltración focal de linfocitos T y macrófagos en la sustancia blanca del SNC;
- Daño tisular: desmielinización, oligodendroglíopatía y daño axonal
- Pérdida de la función neurológica.

La exposición a determinados factores hasta ahora desconocidos, induciría y mantendría las células T autorreactivas que, tras un periodo de latencia, serán activadas sistémica o localmente. Esta activación, podría ocurrir por mecanismos de mimetismo molecular (epítomos compartidos por la mielina y los posibles antígenos infecciosos) (*Albert y Inman 1999; Gran et al 1999*) o por activación policlonal a través de superantígenos bacterianos o virales (*Brocke et al 1996; Johnson et al 1996*).

Las células T activadas producen citoquinas proinflamatorias como el interferón γ (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral (TNF) que provocan la activación de las células endoteliales, las cuales aumentan la expresión de moléculas de adhesión (*Dore-Duffy et al 1993*) que mediarían la extravasación de las células inflamatorias al SNC. Estas células, producen la desmielinización de las neuronas a través de respuestas neuroinflamatorias, que finalmente destruyen la mielina y los axones de las células nerviosas. Todo este proceso tiene como consecuencia la formación de placas en la sustancia blanca del cerebro y en la médula espinal (*Frohman et al 2006; Peterson et al 2007; Trapp et al 1998*) que terminan produciendo pérdida de la función neurológica. Este proceso queda resumido en el **Esquema 2**, que se muestra a continuación.



Esquema 2: Mecanismos patogénicos de la EM

No existe un tratamiento curativo de la EM debido al hecho de que esta enfermedad presenta una clínica muy variable con multitud de mecanismos celulares y moleculares implicados en el desarrollo de la misma (Hohlfeld *et al* 1997). Debido a la naturaleza inflamatoria de la enfermedad, los tratamientos actuales se centran principalmente en terapias anti-inflamatorias tratando los brotes agudos con dosis elevadas de corticosteroides (prednisolona o metilprednisolona) (Miller *et al* 2000). Entre las terapias inmunosupresoras tradicionales, actualmente en desuso, se encuentran medicamentos como la azatioprina, la ciclofosfamida y la mitoxantrona. Todos ellos, tenían como objetivo inhibir la síntesis de ácidos nucleicos para provocar la inhibición de la proliferación y función de los linfocitos B y T.

La terapia actual de primera línea para la EMRR incluye fármacos inmunomoduladores como el IFN-β y el acetato de glatirámico (AG). Mientras el IFN-β incrementa entre otros muchos efectos la producción de citoquinas antiinflamatorias, AG actúa como un señuelo de la mielina para el sistema inmune (Praksova *et al* 2012; Arnold *et al* 2013). La teriflunomida y el dimetil fumarato son otro tipo de tratamientos de primera línea que se administran por vía oral (Jadidi-Niaragh *et al* 2011). La teriflunomida es un inhibidor de la síntesis de pirimidina que disminuye la proliferación y activación de las células B y T autorreactivas (Freedman *et al* 2012). El dimetil fumarato posee eficacia antiinflamatoria y antioxidante.

Como tratamientos de segunda línea están aprobados fingolimod, un agonista inverso de receptores de esfingosina 1 fosfato que induce redistribución de linfocitos autorreactivos con lo que disminuye su paso hacia el SNC, natalizumab, anticuerpo monoclonal contra la α4 integrina (VLA-4) que bloquea la migración linfocitaria hacia el SNC, y alemtuzumab, anticuerpo monoclonal contra

el antígeno CD52 que produce depleción muy prolongada de linfocitos T y B (Zivadinov *et al* 2012). (Broadley *et al* 2014 (3 partes a, b y c); García-Merino *et al* 2013).

Otros medicamentos que han demostrado eficacia son los anticuerpos monoclonales anti CD20, que inducen depleción de células B: rituximab, ocrelizumab y ofatumumab. La terapia de la EM evoluciona rápidamente y hay diversos fármacos en desarrollo para las distintas formas de enfermedad, no sólo para prevenir los brotes o la progresión secundaria sino para controlar la neurodegeneración o mejorar los déficits establecidos, utilizando diversas estrategias farmacológicas.

Los tratamientos aprobados reducen fundamentalmente la frecuencia de los brotes clínicos y la aparición de nuevas lesiones, pero los beneficios a largo plazo en la prevención de la discapacidad son menos claros, y hasta la fecha los ensayos publicados no han demostrado efecto directo en la progresión pura no asociada a actividad inflamatoria (Filippini *et al* 2003). Además, presentan efectos secundarios que pueden ser significativos (Zivadinov *et al* 2012). El hecho de que la medicación actual sea sólo parcialmente eficaz (Karussis *et al* 2006; Steinman *et al* 2001) ha impulsado el planteamiento de nuevos abordajes terapéuticos, como la terapia génica y celular para intentar potenciar los mecanismos de neuroprotección y conseguir regeneración del tejido dañado (Furlan *et al* 2003; Pluchino *et al* 2003; Tohid Gharibi *et al* 2015).

2.2 ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL

La encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) es una enfermedad órgano específica, autoinmune y desmielinizante del SNC que sirve como modelo de EM, ya que comparte con ésta características clínicas, patogénicas e histopatológicas (Lassmann y Wisniewski 1979; Wekerle *et al* 1994).

La EAE es el resultado de la inmunización de una especie susceptible con un antígeno encefalitogénico determinado. Las combinaciones de especies y antígenos dan lugar a diferentes modelos de EAE. Se puede inducir en especies susceptibles, como roedores, conejos y primates, mediante **inmunización activa**, inyectando de forma subcutánea o intradérmica una suspensión de SNC, mielina o antígenos (autólogos o heterólogos) purificados de la misma, emulsificados en adyuvantes (Paterson *et al* 1960; 1976). Otra forma de inducir la enfermedad, es mediante **inmunización pasiva**, es decir, mediante la inyección intravenosa de células T específicas frente a antígenos de la mielina, procedentes de los ganglios linfáticos o del bazo de animales inmunizados activamente, lo que demuestra la naturaleza autoinmune de la enfermedad (Sun D *et al* 2001). También se utiliza como modelo de EM el modelo de enfermedad desmielinizante que se obtiene tras la inoculación de virus como el virus Theiler (Dal Canto y Lipton 1975), virus Semliki Forest (Suckling *et al* 1978) o el coronavirus murino JHM (Weiner *et al* 1973), en el SNC de especies susceptibles.

Los experimentos iniciales en EAE se realizaron en monos ([Rivers et al 1933](#); [Rivers y Schwentker 1935](#)), pero posteriormente se extendió el uso de roedores, cobayas y conejos ([Zamvil y Steinman 1990](#)). No todas las especies son igualmente susceptibles a la inducción de EAE. Estas diferencias, se suelen atribuir a la dotación genética de la cepa y a los polimorfismos existentes en los antígenos del MHC-II y del TCR ([Zamvil y Steinman 1990](#); [Dahlan et al 1999](#); [Roth et al 1999](#)). También las hormonas se han considerado factores importantes en la regulación de la susceptibilidad a la inducción de la enfermedad en ratas Lewis ([Mason et al 1990](#)).

Inicialmente, se utilizó un homogeneizado de SNC para la inducción activa de la EAE ([Kabat et al 1947](#)). Con el avance de las técnicas de purificación de proteínas se extendió el uso de proteínas purificadas de la mielina como la MBP, la PLP, o la MOG principalmente ([Gardinier et al 1992](#); [Pender et al 1995](#)). Más recientemente, se ha descrito la inducción de EAE con otras proteínas relacionadas con mielina como la proteína mielínica básica asociada a los oligodendrocitos (MOBP) ([Holz et al 2000](#)), glicoproteína asociada a la mielina (MAG), glicoproteína específica de los oligodendrocitos (OSP) y 2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa (CNPasa) ([Morris-Downes et al 2002](#)), presente en los oligodendrocitos.

Se utilizan tanto las proteínas completas como péptidos encefalitogénicos de éstas. Sin embargo, la utilización de péptidos ha permitido que los modelos sean más reproducibles, y que especies que eran resistentes al inmunizarlas con la proteína completa, sean susceptibles al inmunizarlas con determinados péptidos.

Tras la inmunización del animal, se lleva a cabo la respuesta inmunitaria contra el antígeno presente en el SNC, y los animales desarrollan los signos clínicos característicos de la EAE. La aparición de los signos clínicos suele ir acompañada de un descenso del peso corporal, que se mantiene hasta que el animal se estabiliza o se recupera.

Los signos clínicos consisten en el desarrollo de una parálisis ascendente, que se inicia con una pérdida de fuerza de la cola que progresa provocando paraparesia o paraplejia y puede llegar a grados de tetraparesia o tetraplejia e incluso en algunos casos provocar la muerte del animal.

Se pueden distinguir diferentes tipos de EAE según el curso clínico:

- la EAE aguda se caracteriza por la aparición de un único episodio clínico de la enfermedad. La especie típica para este modelo es la rata concretamente las ratas Lewis y DA, que son cepas muy susceptibles, y el antígeno utilizado la MBP ([Stepaniak et al 1997](#); [Lenz et al 1999](#)).
- la EAE crónica remitente-recurrente en la que se pueden observar dos o más brotes clínicos de la enfermedad. Para este modelo, habitualmente, se trabaja con ratones SJL inmunizados con PLP, aunque también se ha descrito en ratas ([Raine 1985](#); [Polman et al 1988](#)).
- la EAE no remitente, que sigue un curso progresivo sin brotes y que se ha descrito en ratones C57BL/6, ratones con dotación genética H-2b y ratas inmunizados con MOG ([Mendel et al 1995](#); [Weissert et al 1998](#)). Este mismo curso clínico se ha descrito para ratones con dotación genética H-2u inmunizados con MBP ([Acha-Orbea et al 1988](#)).

Los modelos de EAE reproducen la mayoría de las características histopatológicas de la EM. En el SNC de los animales con EAE, se observan infiltrados inflamatorios perivasculares y parenquimatosos, constituidos principalmente por linfocitos y macrófagos, que han atravesado la BHE (Lassmann *et al* 1980; Polman *et al* 1986; Pender 1987). Posteriormente, se produce la activación de células residentes como la microglía y los astrocitos. En función de la especie, la cepa animal y el antígeno utilizados, las lesiones inflamatorias pueden ir acompañadas o no de áreas de desmielinización.

En la EAE, al igual que sucede en la EM, también se observa daño y pérdida axonal (Raine *et al* 1984; Raine y Cross 1989) y se piensa que éste es el principal responsable de la discapacidad neurológica permanente (Wujek *et al* 2002).

La EAE, al igual que la enfermedad humana, está mayoritariamente mediada por células Th1 y por las citoquinas que secretan, IFN- β , TNF- α , linfotoxinas (LT) e interleuquina 2 (IL-2) (Constantinescu *et al* 1998). Sin embargo, no se puede considerar una enfermedad exclusivamente mediada por estas células. El IFN- β y el TNF- α activan a los macrófagos y éstos tienen la capacidad de destruir la mielina y los oligodendrocitos, así como producir más citoquinas, IL-12, IL-23 y TNF- α , y productos citotóxicos como el óxido nítrico (NO) que también actuarán contra esas dianas. Se ha descrito que los linfocitos Th1 participan en la inducción y propagación de la EAE (Lafaille *et al* 1997). Los linfocitos T CD8+ se ha observado que son abundantes en las lesiones de EM (Kuhlmann *et al* 2002), además, células T CD8+ específicas frente MBP inoculadas en ratones son capaces de inducir EAE (Sun *et al* 2001). Los linfocitos T CD8+ pueden causar apoptosis mediante la expresión de FasL que se unirá a su receptor Fas en la superficie de los oligodendrocitos. Estos linfocitos secretan enzimas como la perforina y la granzima que destruirán la célula diana. Por otra parte, los linfocitos B activados producen autoanticuerpos frente a antígenos de la mielina que se han podido detectar en suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con EM (Berger *et al* 2003). También, es importante mencionar el papel de las células B como APC y cooperadoras con las células T, independientemente de la producción de anticuerpos. En la EAE, se ha observado que la administración de anticuerpos anti MOG exacerba la enfermedad (Linington y Lassmann 1987; Schluesener *et al* 1987; Raine *et al* 1999).

Es importante destacar que existen muchas diferencias entre el modelo de EAE y la EM, entre las que destacan la necesidad de utilizar animales singénicos y antígenos específicos a altas dosis con coadyuvantes, y el predominio de la inflamación sobre la degeneración tardía en la mayoría de los modelos. La EM ocurre en personas genéticamente diversas, se desconocen los antígenos asociados a la inflamación, la topografía lesional es diferente, las anomalías inmunológicas son distintas, el curso clínico difiere, y los modelos animales no reproducen adecuadamente las formas progresivas.

Aun considerando estas diferencias, es el modelo animal más utilizado en el estudio de la EM (Baxter 2007). Por todo ello, se trata del modelo que usaremos en este estudio (EAE inducida con el péptido MOG₃₅₋₅₅) para estudiar la eficacia terapéutica de las células madre mesenquimales de pacientes de EM *in vivo*.

2.3 CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Las células madre, son un grupo específico de células indiferenciadas con un potencial elevado de proliferación que presentan dos características fundamentales: son capaces de autorrenovarse; es decir, de formar células idénticas a las células de origen, y tienen la capacidad de generar uno o más tipos celulares que desempeñan funciones especializadas en el organismo. Dependiendo de su origen las células madre pueden dividirse en células madre embrionarias y adultas.

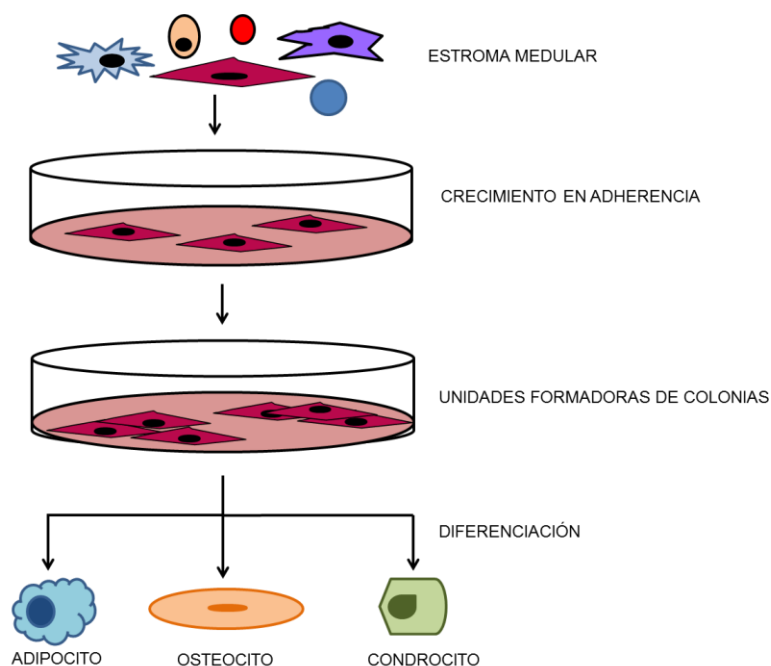
Las células madre embrionarias son células pluripotenciales, es decir, cada una de ellas es capaz de generar todos los tipos celulares del organismo. Por su parte, las células madre adultas son, en su mayoría, multipotenciales ya que pueden generar una gran variedad de tipos celulares dentro de un tejido específico (Mayani H et al 2003).

Dentro del grupo de las células madre adultas, se encuentran las células madre hematopoyéticas y las células madre mesenquimales (CMM), en las que nos centraremos particularmente en este punto, ya que son objeto de nuestro estudio.

Las CMM fueron identificadas por primera vez en la década de los 70 por Friedenstein y cols (Friedenstein et al 1974). Este grupo describió, por primera vez, una población de células adherentes de médula ósea que formaban parte del estroma medular y que daban origen al microambiente hematopoyético. Dichas células fueron denominadas como unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F, Fibroblast Colony-Forming Units). Durante la década de los 80, los investigadores trabajaron en la caracterización y biología estas células, encontrando que las colonias de morfología fibroblastoide, formadas *in vitro* de una suspensión de células procedentes de médula ósea, derivaban de un solo progenitor, y demostraron su gran capacidad proliferativa, su habilidad para autorrenovarse y su multipotencialidad, con capacidad para dar origen a diferentes tipos celulares, entre ellos el osteogénico (Owen M and Friedenstein 1988). Estas células fueron denominadas como células madre estromales. Hasta ese momento, todos los estudios se realizaron en modelos animales, sin embargo, unos años más tarde se desarrolló una metodología que permitía cultivar y trasplantar células mesenquimales de humanos adultos y obtener la formación de hueso (Haynesworth SE et al 1992).

Las CMM, son células madre adultas, multipotentes y no hematopoyéticas, que se caracterizan por su capacidad de diferenciación en tejidos de origen mesodérmico como son los adipocitos, condroblastos y osteoblastos (Pittenger et al 1999; Caplan et al 1991). También, se ha demostrado la plasticidad de este tipo celular, debido a su capacidad para diferenciarse hacia tipos celulares de origen no mesenquimal (transdiferenciación) como son los miocitos, tenocitos y células nerviosas,

entre otros (Black and Woodbury 2001; Jiang et al 2002; Rizvi et al 2006; Sanchez-Ramos et al 2000; Schwartz et al 2002; Tseng et al 2007; Woodbury et al 2000). Tradicionalmente, la médula ósea se ha considerado la fuente principal para el aislamiento de CMM, representando el 0,001-0,01 % del total de las células del estroma medular (Salem HK and Thiemermann C 2010; Pitengger MF et al 1999). Sin embargo, en diversos estudios, se ha demostrado que las CMM pueden ser aisladas a partir de otras fuentes que incluyen la sangre del cordón umbilical (Natalie L Payne et al 2012), sangre periférica (Roufosse CA et al 2004), tejido adiposo (Dicker et al 2005; Levi B et al 2010a; Levi B et al 2010b), folículo capilar (Shih DT et al 2005), piel, músculo, tendón, ligamento periodontal (Kawanabe N et al 2009) y pulpa dental (Yamada Y et al 2006), entre otros. Dado el importante crecimiento de este campo de investigación y la falta de uniformidad en los criterios que definen las CMM, así como la ausencia de un marcador específico; la *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) ha establecido tres criterios mínimos, para crear un consenso y uniformidad en la caracterización de estas células, con el fin de poder comparar los resultados obtenidos en los diversos estudios experimentales y clínicos, como se puede observar en el **esquema 3**. La ISCT define las CMM humanas como todas aquellas células con: morfología fibroblastoide, adherencia al plástico y que crecen como unidades formadoras de colonias (UFC) en condiciones de cultivo estándar; un fenotipo positivo ($\geq 90\%$) para CD105, CD73 y CD90 y negativo ($\leq 2\%$) para los antígenos hematopoyéticos CD45, CD34, CD14, CD19 y HLA-DR; y capacidad de diferenciación *in vitro* a los linajes osteogénico, condrogénico y adipogénico, bajo condiciones de diferenciación estándar (Horwitz EM et al 2005; Dominici M et al 2006).



Esquema 3: Criterios mínimos que definen y caracterizan a las CMM según la ISCT.

Por otro lado, las CMM producen citoquinas, quimioquinas y proteínas de la matriz extracelular que mantienen la supervivencia y el injerto de las CMH, influyen en el desarrollo, maduración y función

de las células inmunes efectoras; e inhiben la respuesta de las células T alorreactivas (Majumdar MK et al 2000; Kim DH et al 2005).

Además de sus propiedades como progenitoras, las CMM presentan propiedades inmunorreguladoras, ya que modulan la respuesta inmune por su interacción con un amplio rango de células inmunes, incluyendo linfocitos T, B, células *Natural Killer* (NK), células dendríticas y células T reguladoras (Treg). La función inhibidora de las CMM es un proceso dependiente del contacto celular (célula-célula) y de la liberación de factores solubles como IL-6, IL-10, indolamina dioxigenasa (IDO), factor de crecimiento transformante β (TGF- β), IFN- γ , prostaglandina E2 (PGE2) y NO (Prasanna SJ et al 2010; Keating A et al 2012). Se ha demostrado que las CMM son capaces de influir en las respuestas inmunes adaptativa e innata tanto *in vitro* como *in vivo* (Bartholomew A et al 2002; Di Nicola M et al 2002). Waterman y cols. sugieren que las CMM actúan como sensores de la inflamación y pueden adoptar dos fenotipos de funciones diferentes (MSC1 o MSC2) siguiendo una activación específica de los receptores TLR (del inglés Toll-like receptors), TLR3 y TLR4, que resulta en diferentes efectos inmunomoduladores y con distintos secretomas (Waterman et al 2010). Recientes estudios han demostrado que las CMM interactúan de forma activa con elementos del sistema immune innato, y que a través de estas interacciones producen efectos anti inflamatorios y pro inflamatorios (Keating A 2012; Le Blanc and Mougiakakos 2012; Prockop and Oh 2012).

La administración de las CMM, se presenta como una estrategia alternativa para el tratamiento de enfermedades de base inmunológica, y sus propiedades inmunosupresoras han sido exploradas en enfermedades autoinmunes experimentales, así como en trasplantes de órganos (De Miguel MP et al 2012; Figueroa FE et al 2012; Pistoia V et al 2010; Casiraghi F et al 2013).

Las CMM, y más concretamente las procedentes de médula ósea, son las células madre adultas mejor caracterizadas; y son muy prometedoras para terapia celular en EM (Ben-Hur et al 2013) por las siguientes razones:

- Son relativamente accesibles: el aspirado de la médula ósea y el aislamiento y expansión de las células, son procedimientos bien establecidos en la disciplina hematológica. Además, son células que presentan un gran potencial de expansión y plasticidad; y su manejo no involucra los dilemas éticos que presentan las células madre embrionarias.
- Tienen una alta capacidad para migrar hacia los tejidos dañados: los estudios con animales y humanos, siguiendo una administración intravenosa (i.v) muestran que las células son capaces de migrar al sistema nervioso central (Cogle CR et al 2004; Weimann JM et al 2003) y pueden disminuir las consecuencias clínicas de enfermedades desmielinizantes en modelos animales (Gordon D 2008; Zhang et al 2005; Zappia E et al 2005). Existe un debate sobre cómo estas células pueden ejercer sus efectos beneficiosos; aunque se ha demostrado transdiferenciación a células neurales *in vitro* (Bossolasco P et al 2005; Wislet-

Gendebien et al 2005), *in vivo* esto parece controvertido y muchos sugieren que no está demostrado (Parr AM et al 2007)

- Las CMM son capaces de fusionarse con algunos tipos celulares neurales lo cual supone un mecanismo importante de neuroprotección definido como “rescate” (Singec I et al 2008).
- Están bien documentadas las propiedades inmunorreguladoras de las CMM (Uccelli A et al 2006). La capacidad de las CMM para inhibir la proliferación de las células T *in vitro* e *in vivo* ha sido investigada en profundidad (Mazzanti B et al 2008; Carlo-Stella C et al 2002; Gerdoni E et al 2007; Krampera M et al 2003; Rasmusson I et al 2005; Bartholomew A et al 2002). Además, su capacidad inmunorreguladora es independiente del complejo mayor de histocompatibilidad.
- También, hay estudios que demuestran que las CMM son capaces de producir factores neurotóxicos que promueven la supervivencia neuronal *in vitro* (Crigler L et al 2006; Wilkins A 2009).
- A diferencia de los tratamientos actuales, su potencial de acción consiste en aumentar la remielinización a la vez que modula la respuesta inmunológica (Uccelli et al 2007a; Uccelli et al 2007b; Payne et al 2011).

El potencial beneficioso de las CMM ha sido demostrado por una serie de estudios en EAE. Dos estudios preliminares demostraron que la administración sistémica de CMM de médula ósea puede modular las respuestas inmunes induciendo tolerancia periférica y disminuyendo la enfermedad y observando una mejora clínica en los animales EAE (Gerdoni et al 2007; Zappia et al 2005). Estos efectos periféricos han sido confirmados en otros estudios, tras la administración de CMM por vías i.v (Gerdoni et al 2007; Zappia et al 2005; Bai L et al 2009; Kassis I et al 2008; Constantin G et al 2009; Gordon D et al 2010; Natalie L Payne et al 2012; Morando S et al 2012), intraperitoneal (i.p) (Gordon D et al 2008; Rafei M et al 2009a; Rafei M et al 2009b) e intracerebroventricular (i.cv) (Yael Barhum et al 2009). Varios grupos demuestran que un pequeño número de CMM de origen murino (Constantin G et al 2009; Kassis et al 2008) o humano (Bai L et al 2009; Gordon et al 2010) son capaces de entrar en el SNC y ejercer, *in situ*, efectos inmunomoduladores y neuroprotectores.

El potencial de neuroprotección, las propiedades de reparación y los resultados prometedores obtenidos en estudios *in vivo*, junto con una clara y explícita seguridad (en relación a terapias autólogas no mieloblastivas), han justificado varios ensayos clínicos para explorar el uso de CMM autólogas administradas por vía i.v en EM (Connick P et al 2011; Karussis D et al 2010; Connick P et al 2012; Mohajeri M et al 2011; Rice CM et al 2010) e intratecal (i.t) (Mohyeddin Bonab M et al 2007, Karussis D et al 2010; Yamout et al 2010)

Casi la totalidad de los ensayos clínicos con CMM para el tratamiento de la EM, se han realizado con CMM autólogas (procedentes del propio paciente). Sin embargo, en todos los estudios con EAE, se han utilizado CMM humanas procedentes de individuos sanos. En la bibliografía existe aún

controversia (Papadaki HA et al 2005; Mazzanti et al 2008; Elizabeth Mallan et al 2010; Gisiane LV de Oliveira et al 2013, Marina M Zafranskaya et al 2013), en cuanto si las CMM de pacientes de EM, presentan las mismas características fenotípicas y funcionales, que las CMM procedentes de individuos sanos, *in vitro*. Además, existe un gran desconocimiento respecto a la eficacia terapéutica de las CMM de pacientes de EM *in vivo*. Por todo ello, en este trabajo nos centraremos en el estudio comparativo de las CMM de pacientes de EM y donantes sanos en cuanto a sus características fenotípicas y funcionales *in vitro*, y su potencial terapéutico, *in vivo*, en la EAE.

2.4 CANNABINOIDES

Las primeras evidencias del uso medicinal del cannabis (*Cannabis Sativa*) se remontan al año 2737 a.C en China, durante el reinado del emperador Sheng-Nung, quien recoge en sus escritos de farmacopea la utilidad de la planta para tratar los calambres y el dolor reumático o menstrual. También en el antiguo Egipto existen testimonios del uso del cannabis para el tratamiento de diversas dolencias. En Europa durante el siglo XIX, el cannabis destaca por su uso médico como analgésico, antiinflamatorio, antiemético y anticonvulsivo, hasta su prohibición en 1925, cuando la convención de Génova lo incluye dentro de la lista de drogas ilícitas y peligrosas. En la actualidad se han desarrollado avances en el uso terapéutico legal de la planta, como demuestra la comercialización del fármaco Sativex® (que se detalla más adelante) para distintos tratamientos en humanos.

La planta *Cannabis Sativa* contiene más de 421 compuestos químicos, denominados ligandos cannabinoides por su estructura carbocíclica de 21 carbonos. Los ligandos llamados fitocannabinoides, son más de 80 compuestos solubles lipídicos, que se encuentran en la resina producida por las plantas femeninas del cannabis y son sintetizados a partir de precursores de ácidos grasos por una serie de transferasas y sintetasas (Elsohly MA 2005; Izzo AA 2009). Entre los compuestos mayoritarios destaca Δ^9 tetrahidrocannabinidiol (Δ^9 -THC), con una elevada actividad psicotrópica. También destacan los fitocannabinoides con pocas o ninguna propiedades psicoactivas como el Cannabidiol (CBD), Cannabigerol (CBG), y Cannabidivarina (CBDV), que ejercen múltiples acciones a través de mecanismos que solo pueden ser relacionados parcialmente con la modulación del sistema endocannabinoide (SEC) (Mechoulam et al 2007; Pertwee et al 2008), y que también ejercen acciones sobre receptores de potencial transitorio (canales TRP), receptores activados de proliferación de peroxisomas gamma (PPAR γ), receptores acoplados a proteína G 55 (GPR55), GPR18, 5-hidroxitriptamina 1A (5-HT1A), receptores de glicina $\alpha 1$ y $\alpha 1\beta$, enzimas ciclooxigenasa 2 (COX-2) y en receptores implicados en la homeostasis del Ca^{2+} (Izzo et al 2009). El CBD (constituye el 40% del extracto de la planta) podría presentarse como el mejor candidato para el uso clínico de los fitocannabinoides, ya que se trata de un compuesto que carece de acciones psicoactivas y cognitivas y posee una excelente tolerancia en humanos (Mechoulam et al 2002). Debido a su baja toxicidad, se han realizado numerosos ensayos clínicos en distintas

patologías, entre ellas la EM, utilizando Sativex® (preparación comercial que contiene Δ 9-THC y CBD en proporciones similares). Cabe destacar que su administración por nebulizador oromucosal fue legalizado en 2005 para el tratamiento sintomático de la EM (Perras 2005), y desde 2010 su uso está aprobado en nuestro país.

Hace 30 años se describieron y clonaron los receptores de cannabinoides explicando el modo de acción de los extractos del cannabis, permitiendo la identificación y aislamiento de sus equivalentes y homólogos endógenos llamados endocannabinoides (eCBs). Los eCBs son amidas, ésteres y éteres de cadenas largas de ácidos grasos poliinsaturados, que son sintetizados en respuesta a estímulos fisiológicos o patológicos. Una vez sintetizados, se unen a sus receptores diana, funcionalmente activos, causando diferentes efectos biológicos en distintos tejidos (Pertwee RG 2010). Entre los componentes endógenos se encuentran aquellos derivados del ácido araquidónico, siendo los más importantes la N-araquidonil-etanolamida o anandamida (AEA, metabolizada principalmente por la enzima amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH)), el 2-araquidonilglicerol (2-AG, principalmente degradado por la enzima monoacilglicerol lipasa (MAGL)), y otros compuestos como el 2-araquidonil gliceril-éter (Noladin éter), el N-araquidonil-dopamina (NADA), o la O-araquidoniletanolamina (Virodhamina), todos ellos derivados de ácidos grasos de membrana. Existen otros derivados de ácidos grasos endógenos que se consideran eCBs por su capacidad de potenciar la actividad de AEA y 2-AG a través del mecanismo “encourage effect”, como son palmitoiletanolamida (PEA), estearoiletanolamida (SEA), oleoiletanolamida (OEA), araquidonilglicina, 2-lineloilglicerol, 2-palmitoilglicerol y oleamida (Hanus 2007). Además, están los cannabinoides sintéticos que pueden actuar sobre los receptores cannabinoides como el HU-210 y el WIN55,212-2 (WIN), que actúa como el Δ 9-THC.

En los últimos años se ha podido descubrir y caracterizar un sistema de señalización endógena, SEC, cuyos elementos están compuestos por los ligandos endógenos clasificados como eCBs, sus receptores, los componentes responsables de la síntesis e inactivación de los mismos y por mecanismos específicos de recaptura.

Los principales receptores diana de los fitocannabinoides y los eCBs son los receptores de cannabinoides CB₁ y CB₂. Son receptores asociados a proteínas G con siete dominios transmembrana (Pertwee RG et al 2012; Di Marzo V 2012).

CB₁ es expresado extensamente en el SN principalmente en las zonas terminales de las neuronas centrales y periféricas, y su presencia ha sido investigada en muchos sitios diferentes extraneuronales (Pertwee RG 2010). Una vez activado CB₁, está involucrado en la inhibición de la neurotransmisión excitatoria e inhibitoria; y puede modular funciones cognitivas, motoras, de memorias y analgesia (Bari M et al 2005; Macarrone M 2008).

CB₂ principalmente se expresa en las células del sistema inmunitario, donde se encuentra asociado a la regulación de diferentes funciones inmunes (Galiègue S et al 1995; Klein TW et al 2005; Pandey R et al 2009; Cencioni MT et al 2010; Bisicchia E et al 2013). Sin embargo, su identificación

en neuronas (Izzo AA 2009; Van Sickle MD et al 2005), células microgliales activas, astrocitos (Ramirez BG et al 2005; Shoemaker JL et al 2007) osteoclastos, queratinocitos, células de piel tumorales (Luongo L et al 2010; Matsuda LA et al 1990; Munro S et al 1993), y ciertas subpoblaciones de neuronas (Viscomi MT et al 2009; Atwood BK et al 2010). La activación de CB₂, se ha visto relacionada con inflamación crónica del SN, así como con trastornos inmunológicos, cardiovasculares y óseos (Guitierrez T et al 2011; Palazuelos J et al 2009; Ramirex SH et al 2012). En los últimos años existen trabajos que señalan la existencia de receptores cannabinoides adicionales, distintos a CB₁ y CB₂ que podrían mediar efectos específicos a nivel de transmisión sináptica, sistema vascular y sistema inmune, como son el receptor GPR55 (Ryberg et al 2007; Lauckner et al 2008) y el receptor GPR18 (Offertaler et al 2003). Además, los cannabinoides pueden unirse a receptores específicos de otros sistemas de señalización como son el receptor vanilloide de tipo 1 (TPRV1) (Jordt et al 2004), receptores activados por proliferadores de peroxisomas o PPARs (Sun y Bennett 2007).

CB₁ y CB₂ son receptores metabotrópicos que normalmente se unen a proteínas heterotriméricas G i/o y que desencadenan señales de transducción que implican la reducción de los niveles de adenosin monofosfato (AMP) cíclico mediante la inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa, la regulación de flujos de Ca²⁺, la activación de canales rectificadores de K⁺ y de los canales dependientes de voltaje de tipo A (Castillo PE 2012). Además se ha observado que ambos receptores pueden regular la producción de ceramida, la activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la estimulación de la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS). En determinadas circunstancias, dependiendo de la disponibilidad de las subunidades de las proteínas G, la dimerización con otros receptores asociados a proteína G o los ambientes celulares particulares, pueden ocurrir distintos patrones de unión como Gq/11 o Gs, y por tanto, ejercer diferentes acciones en la regulación de la señalización (Pertwee RG et al 2010).

Debido a las acciones neuroprotectoras, antiinflamatorias y antioxidantes de los cannabinoides, estos compuestos se han tomado en cuenta como posibles agentes terapéuticos en enfermedades neurodegenerativas con un componente inflamatorio como Alzheimer, Parkinson, enfermedad de Huntington y EM. Estas enfermedades presentan hiperactividad en la microglía secretando citoquinas y quimioquinas pro y anti inflamatorias, glutamato, factores neurotróficos, prostanoïdes y radicales libres que provocan estrés oxidativo. Hay evidencias que demuestran que la alteración de la producción de citoquinas inducida por los endocannabinoides, como la AEA y 2-AG, puede actuar como inmunosupresor cuando se añaden a linfocitos T activados, actuando principalmente a través del receptor CB₂ (Cencioni MT et al 2010). Uno de los usos clínicos más prometedores de los cannabinoides está en el tratamiento sintomático de la EM. Hay numerosas revisiones en la literatura que mencionan el papel neuroprotector e inmunomodulador de los cannabinoides, presentándolos como buenos candidatos en las estrategias terapéuticas de la EM.

Por todo ello los compuestos cannabinoides, han sido testados en modelos animales para evaluar su efecto sobre la EM en estudios preclínicos. Lyman et al 1989 han demostrado que la administración de Δ^9 -THC retrasa el inicio de los signos clínicos y reduce la inflamación del SNC en la EAE. El tratamiento con cannabinoides sintéticos (Baker et al 2000), eCBs, PEA (Baker et al 2001), o inhibidores de la recaptura de eCBs (Baker et al 2001; De Lago et al 2004, 2006) reducen la espasticidad y mejora el temblor en el modelo de recaída crónica de EAE (CREAE), a través de un mecanismo mediado por el receptor CB₁ (Pryce y Baker, 2007). La administración crónica de cannabinoides puede inhibir el proceso neurodegenerativo en este modelo (Pryce et al 2003; Croxford et al 2008).

Algunos estudios revelan un efecto inmunosupresor vía CB₁, por el que los agonistas cannabinoides consiguen reducir la respuesta de células T específicas de mielina, la infiltración del SNC y los síntomas clínicos (Maresz et al 2007; Croxford et al 2008).

La administración del agonista mixto WIN consigue disminuir los signos clínicos, reducir la infiltración celular e inducir la apoptosis de células T, lo que podría contribuir a su acción anti-inflamatoria, a través de un efecto mediado, en parte, por CB₂ (Sánchez et al 2006).

En ratones *knockout* para CB₂ la gravedad de la EAE aumenta y los niveles de mensajero de varias citoquinas y sus principales receptores también aumentan. En cambio, el tratamiento con el agonista selectivo de CB₂, HU-308, en ratones *wild type* mejora la progresión de la enfermedad y reduce los niveles de estas citoquinas y sus receptores, confirmando el papel protector de CB₂ (Palazuelos et al 2008).

La efectividad de los cannabinoides reduciendo los signos clínicos de la EAE (inducida por péptidos de mielina o inducida por virus) en roedores ha sido demostrada en varios trabajos usando principalmente ligandos con afinidad por ambos receptores (CB₁ y CB₂). Los efectos inmunosupresores de estos ligandos tienen lugar a dosis que inducen efectos como sedación e hipotermia (Lyman et al 1989; Croxford et al 2008). Sin embargo, se ha visto que hay compuestos como el CBD y sus derivados que están desprovistos de efectos psicotrópicos y que son tolerables en humanos cuando se administran de forma crónica (Cunha et al 1980; Consroe et al 1991). Cuando se administra CBD de forma sistémica durante 3 días (19, 20 y 21 PI) del desarrollo de la enfermedad en ratones EAE, se observa una disminución de los signos clínicos y de su progresión (Ewa Kozela et al 2011). Este efecto además, se ve acompañado de una disminución del daño axonal y de la infiltración y activación de linfocitos T y células de microglia. Por otro lado, observan que el CBD disminuye la proliferación de las células T autorreactivas inducidas con MOG *in vitro*.

Debido a los resultados obtenidos en los modelos animales de EM, muchos ensayos clínicos han evaluado el potencial terapéutico de extractos medicinales basados en *cannabis* para el tratamiento de los síntomas de la enfermedad (Smith 2007 review).

En los primeros ensayos se evaluó la eficacia de los cannabinoides en la espasticidad asociada a EM. Pero estos estudios incluían un número reducido de pacientes y sus resultados no

presentaban una eficacia objetiva ([Pertwee 2002 review](#)). Posteriormente, en el año 2001, se inició el estudio “Cannabinoids and Multiple Sclerosis (CAMS)” en el que participaron 630 pacientes con EM y espasticidad muscular tratados durante 15 semanas con un extracto de cannabis oral, Δ 9-THC, o placebo. Los resultados no mostraron un efecto beneficioso sobre la espasticidad ([Zajicek et al 2003](#)). Sin embargo, los pacientes que continuaron el tratamiento con Δ 9-THC hasta los 12 meses, notaron, con pocos efectos adversos, una mejoría en su espasticidad, confirmada de forma objetiva por la escala de Ashworth ([Zajicek et al 2005](#)).

En un estudio posterior, 50 pacientes de EM con poco control de la espasticidad tratados durante 14 días con un extracto estandarizado de *Cannabis sativa* en cápsulas (2,5 mg Δ 9-THC y 0,9 mg CBD), mostraron una frecuencia menor de espasmos y una mejoría en la movilidad, además de una buena tolerancia a los efectos secundarios del tratamiento ([Vaney et al 2004](#)).

En otro ensayo clínico utilizando Sativex (que contiene Δ 9-THC y CBD en igual proporción) se observó una reducción significativa del dolor y alteraciones del sueño en pacientes de EM, que se trataron durante 4 semanas ([Rog et al 2005](#), [Rog et al 2007](#)). Por otro lado, en otro estudio controlado, con dosis más bajas de Sativex, se demostró una reducción significativa en espasticidad, sin efectos adversos y un grado de intoxicación leve tras 6 semanas de tratamiento ([Wade et al 2004](#)).

La eficacia terapéutica de los cannabinoides en el tratamiento de EM va en aumento, pero todavía no son convincentes ([Wade et al 2006](#); [Smith 2007](#)). Los cannabinoides proporcionan efectos beneficiosos en espasticidad y dolor, pero existe la preocupación de los efectos secundarios a largo plazo, aunque los efectos adversos son más leves que los producidos por otros fármacos para el dolor y la espasticidad.

Las rutas de señalización de los cannabinoides regulan la proliferación celular, diferenciación y supervivencia con diferentes resultados dependiendo de las dianas moleculares y el contexto celular involucrado.

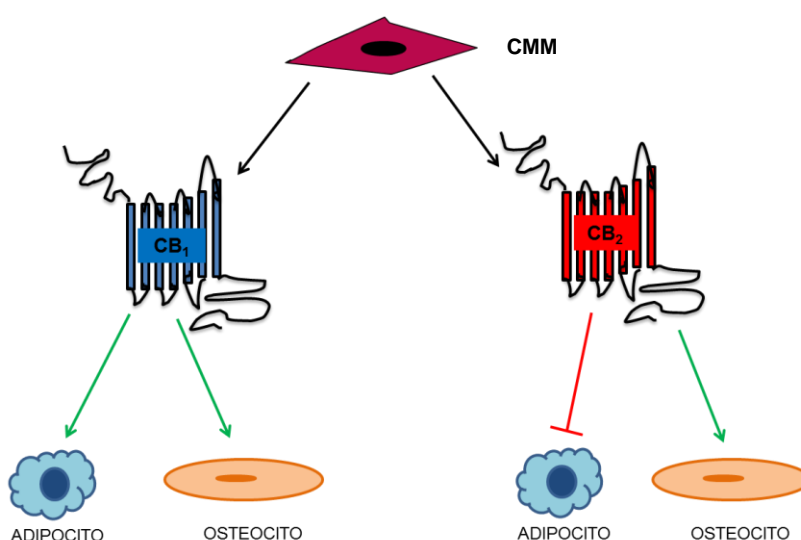
Los receptores de cannabinoides se expresan y funcionan desde etapas muy tempranas del desarrollo cuando regulan la supervivencia y diferenciación de las células madre embrionarias y trofoblásticas, y por lo tanto, deben afectar a la formación de tejidos adultos especializados derivados de las tres líneas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo).

Estudios recientes, han puesto de manifiesto la presencia del SEC en células precursoras hematopoyéticas y neurales ([Compagnucci C et al 2013](#); [Jiang S et al 2011](#); [Bari M et al 2011](#); [Jiang S et al 2007](#)). Los cannabinoides han demostrado ser reguladores de la proliferación y diferenciación de las células madre hematopoyéticas y mesenquimales derivadas del mesodermo, jugando un papel fundamental en la determinación de la formación de varios tipos celulares de los tejidos periféricos incluyendo células sanguíneas, adipocitos, osteoblastos/osteoclastos y células epiteliales. En las últimas décadas hay evidencias de que los receptores de cannabinoides tienen un papel en la regulación del compromiso de las células madre progenitoras neurales y las células

madre progenitoras hematopoyéticas, derivadas del mesodermo. CB₁ y CB₂ regulan varias cascadas de quinasas relacionadas con la supervivencia y proliferación celular con principales consecuencias en el potencial de decisión de las células progenitoras. Ambos receptores regulan las rutas PI3K/PKB y ERK que se encuentran en la mayoría de los sistemas celulares estudiados (Ismael Galve-Roperh-2013).

La homeostasis de la médula ósea se sustenta por un conjunto de interacciones de factores de crecimiento, citoquinas y factores de transcripción, que orquestan la proliferación y diferenciación de células madre (hematopoyéticas, mesenquimales y progenitores endoteliales) en más de un tipo celular. Las células del estroma de la médula ósea, se ha mostrado que sintetizan y liberan eCBs “a demanda”, y expresan sus receptores específicos CB₁ y CB₂. Especialmente hay evidencias que apuntan a los eCBs como mediadores de la migración e instalación de las células madre hematopoyéticas en los tejidos in vivo (Jiang S et al 2011).

En cuanto a las CMM humanas, existe un conocimiento muy escaso de la presencia y regulación del SEC y su posible papel en la actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora. En la literatura existe una gran controversia sobre la presencia y expresión de los receptores CB₁ y CB₂ (**Esquema 4**) y el efecto de cannabinoides endógenos y exógenos sobre las funciones y características de las CMM humanas (Francesca Rossi et al 2013; A. Scutt 2007; Ellen Schmuhl et al 2013; Yong-Xin Sun et al 2014; Seyeon Ahn et al 2015). Además, todos los estudios se han realizado en CMM humanas procedentes de donantes sanos, y se ha mostrado que existen diferencias en la expresión de los receptores CB₁ y CB₂ en otros tipos celulares de individuos sanos y pacientes de EM (L. Jean-Gilles et al 2015; A.J. Sánchez López et al 2014).



Esquema 4: Implicación de los receptores de cannabinoides en la regulación de la diferenciación de las CMM.

Por todo lo anterior, en este estudio nos centraremos en la caracterización del SEC en las CMM de donantes sanos y pacientes de EM. Además, analizaremos el posible efecto del cannabinoide endógeno (AEA) y los exógenos (CBD y WIN); sobre las funciones y características de las CMM, procedentes tanto de individuos sanos como de pacientes de EM.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

En el presente trabajo se comparan características fenotípicas y funcionales de las células mesenquimales multipotenciales del estroma de médula ósea de pacientes de EM con las de sujetos sin patología hematológica o inmunológica. Además, se evalúa el efecto terapéutico de las células de ambas procedencias en la encefalomiелitis autoinmune experimental y la implicación del sistema cannabinoide en la funcionalidad de las mismas, *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener y expandir CMM de médula ósea de pacientes con esclerosis múltiple y de controles.
2. Caracterizar fenotípicamente las CMM, su capacidad de formación de colonias y de transformación trilinear (adipogénesis, osteogénesis y condrogénesis).
3. Valorar la capacidad antiproliferativa e inmunomoduladora de las CMM frente a células T estimuladas (con estímulo inespecífico y frente a autoantígenos); y la capacidad productora de las citoquinas IL-4, IL-6, IL-10 e IFN- γ ; y el factor neurotrófico NGF, de las células de pacientes y controles.
4. Analizar la capacidad supresora de las CMM de controles y pacientes de EM, en la EAE, tanto en sus aspectos clínicos como histopatológicos, con especial atención en el daño axonal o neurodegeneración.
5. Caracterización de los receptores CB₁ y CB₂ en las CMM de controles sanos y pacientes. Evaluar su respuesta frente a cannabinoides endógenos (AEA) y exógenos (WIN y CBD), valorando su capacidad de formar colonias y de diferenciación trilinear, su potencial antiproliferativo e inmunomodulador, y su capacidad productora de citoquinas (IL-4, IL-6, IL-10 e IFN- γ) y el factor neurotrófico NGF.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 SELECCIÓN DE CONTROLES Y PACIENTES

El estudio se llevó a cabo con pacientes de EM y controles sin enfermedad autoinmune ni hematológica. Las muestras de médula ósea se obtuvieron en la Unidad de Esclerosis Múltiple del Hospital Universitario Puerta de Hierro, con previa autorización por el CEIC (Comité Ético de Investigación Clínica) del Hospital; todo ello bajo cumplimiento de los principios de la declaración de Helsinki y la norma E6 de Buenas Prácticas clínicas de la ICH. Los individuos incluidos en el estudio, cumplían los siguientes criterios de inclusión para cada grupo:

Pacientes:

- Diagnóstico de EM según criterios clásicos de Poser
- Forma recidivante-remitente o secundariamente progresiva sin evidencia de recaídas o de actividad inflamatoria reciente demostrable por neuroimagen en los últimos 6 meses
- Puntuación en la escala expandida de discapacidad de Kurtzke $\leq 6,5$,
- Duración mínima de la enfermedad de 5 años
- Edad ≤ 60 años
- Firma de consentimiento informado.

Quedaron excluidos todos aquellos pacientes que presenten tratamiento inmunosupresor, exposición a terapias experimentales, tratamiento inmunomodulador en el año anterior y utilización de esteroides en los 3 meses anteriores a la obtención de la muestra.

Controles:

- Donantes sanos
- Edad ≤ 60 años
- Firma de consentimiento informado.

Quedaron excluidos todos los individuos con enfermedad autoinmune, enfermedad hematológica, transfusiones previas, tratamiento con inmunosupresores y tratamiento esteroideo en los 3 meses anteriores a la toma de la muestra.

4.2 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA DE MÉDULA ÓSEA

Las muestras de los pacientes y controles seleccionados, se recolectan en quirófano tras anestesia local por aspirado de médula ósea mediante punción en cresta ilíaca anterior o posterior (con un volumen aproximado de 30 ml).

En la extracción, el aspirado de médula ósea se llevó a cabo con el uso de un trócar canulado con punta de doble diamante y agujeros laterales (Angiotech-Wacress S.A), previamente heparinizado. Estos procedimientos, se llevan a cabo por hematólogos y anestesistas del Hospital Universitario Puerta de Hierro. La muestra se recoge en una bolsa de extracción de polipropileno (Laboratorios Grifols S.A) con medio de transferencia (heparina y antibiótico), que presenta doble puerto; uno termosellado y otro con un sample porter (Fenwal^R) por donde se introduce la muestra de manera estéril, ya que una vez introducida la muestra queda cerrada por una válvula. Dado que la población de CMM en la muestra representa aproximadamente el 0,001% del total de células mononucleares, guardamos una pequeña alícuota, para realizar un conteo previo de células mononucleares presentes en la muestra extraída. Un total de células mononucleares menor de 100×10^6 sería descartado, ya que el cultivo primario de CMM sería inviable.

Posteriormente, las muestras se transportan a temperatura ambiente y en bolsas estériles al laboratorio, donde son procesadas bajo condiciones de total esterilidad. La obtención y expansión de las CMM se realizó siguiendo el protocolo que se aplica en sala GMP (Good Manufacturing Practises).

4.3 CULTIVO PRIMARIO DE CMM

La muestra de médula recolectada, diluida en medio de transferencia (1:1) en la bolsa de extracción, se deposita en tubos para posteriormente realizar la separación de células mononucleares en una proporción 1:2 por gradiente de densidad con Ficoll-HypaqueTMPlus (Stem Cell Technologies Inc.), centrifugando las muestras a 1200-1300 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se recogen las células mononucleares de la interfase de los tubos centrifugados, y se resuspenden en medio de lavado: alfa-MEM (Lonza, Cultek) suplementado con 2,5% de suero fetal bovino Australiano (SAFC), 1% de penicilina/estreptomicina (Biowest) y 2,2% L- Glutamina (Biowest). Tras centrifugar de nuevo las células a 1200-1300 rpm durante 20 minutos se vuelven a resuspender en 1 ml de medio de lavado realizando un recuento celular con azul tripán al 0,05% para determinar la viabilidad celular.

A partir de las CMN obtenidas se inician los cultivos con 16×10^4 CMN en flask de 75cm² (Nunc) y 10ml de medio de cultivo alfa- MEM suplementado con 20% de SAFC, 1% de penicilina/estreptomicina y 2,2% L- Glutamina.

Los cultivos se mantienen a 37°C con 5% de CO₂; transcurridas 72 horas, se retiran las células no adherentes mediante el cambio de medio de cultivo y después de 8 días se observa la aparición de células adherentes con morfología fibroblastoide.

El cultivo primario de CMM se mantiene (cambiando de medio de cultivo cada 3-4 días) hasta obtener una confluencia del 80-90% en medio alfa-MEM suplementado con 20% de SAFC, 1% de penicilina/estreptomicina y 2,2% L- Glutamina. En esta confluencia se realiza el pase de las células por medio de tripsinización (Trypsina 0.25% y ácido etildiaminotetraacético (EDTA) 1Mm (Biowest)).

Las células se cultivan de nuevo para su expansión hasta un máximo de 5 pases usando a partir del primer pase medio alfa-MEM suplementado con un 10% de SAFC, 1% de penicilina/estreptomicina y 2,2% L-Glutamina. La expansión de las CMM a partir del pase 0 (P#0) se realiza en factorías de cultivo (Thermo Scientific) de 1, 2 o 3 plantas dependiendo del número de células de partida (3, 6 y 9 millones de células respectivamente) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se mantienen en factoría hasta un total de 6-7 días con un cambio de medio a los 3-4 días. Una vez tripsinizadas, las células se recogen en Falcon estériles (Corning, Cultek) y se centrifugan a 1200 rpm durante 5 minutos. Después se lavan con buffer fosfato salino (PBS) y se cuentan en cámara de Neubauer con azul tripán al 0,05%. Las células se resuspenden en PBS para los ensayos *in vivo* y el resto en medio completo para ensayos *in vitro*, se plantan en flask (a una concentración de 5.000 células/cm²), o se congelan en 1ml de SAFC con 10% de DMSO (Sigma-Aldrich), conservándose en nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C.

Para su utilización, las CMM se descongelan en un baño a 37°C, y tras 3 lavados con PBS 1X se resuspenden en medio suplementado con 10% de SAFC, 1% de penicilina/estreptomicina y 2,2% L-Glutamina.

4.4 OBTENCIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE BAZO Y GANGLIO DE RATONES EAE: CÉLULAS ENCEFALITÓGENAS DE RATÓN

Para obtener células encefalitógenas de ratón se extraen ganglios y bazos de ratones hembra C57/BL6 (Charles River) EAE (inmunizados como se explica en el apartado posterior de inducción de EAE) sacrificados con CO₂ y perfundidos intracardiamente con PBS a los 10-12 días después de su inmunización. Los ganglios (linfáticos, axilares e inguinales) y los bazos se homogeneizan de forma mecánica por separado con Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (Lonza) y las células obtenidas se centrifugan a 1200 rpm durante 5 minutos. Las células de bazo se resuspenden en tampón de lisis de eritrocitos Ammonium-Chloride-Potassium (ACK) durante 5 minutos en hielo y se resuspenden en medio completo específico para células encefalitógenas (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) con 10% de Suero fetal bovino (SBF), 1mM de piruvato sódico, 10mM de aminoácidos no esenciales, 4mM de L-glutamina, 100U/ml de penicilina/estreptomicina y 50µM de 2-mercaptoetanol (Lonza)), para inactivarlo. Las células se centrifugan de nuevo y se resuspenden

en medio completo fresco, para realizar un recuento de la viabilidad celular con azul tripán. Se realiza una mezcla de los dos tipos celulares en una proporción 1:5 (ganglio:bazo) y las células se distribuyen a una concentración de 5×10^6 células/ml en medio completo de encefalitógenas. A las células en cultivo se añaden 25 µg/ml de MOG₃₅₋₅₅ y 25 ng/ml IL-12 durante 72 horas para estimular y mantener las células encefalitógenas.

4.5 OBTENCIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMC)

Tras la firma del consentimiento informado por parte de donantes sanos, se procede a la extracción de sangre periférica de los mismos. La sangre se diluye 1:2 en PBS 1X con 0,2% SBF y se reparte en tubos con Lymphoprep^R (Axis-Shield PoC AS) en una proporción 1:4; los cuales se centrifugan durante 20 minutos a temperatura ambiente a una velocidad de 2500 rpm. Posteriormente, se recoge la capa celular de la interfase que consiste en las PBMC, se lava en PBS 1X y se procede al recuento con azul de tripán. Las células se congelan en criotubos con 1 ml de SBF con 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) en nitrógeno líquido hasta su uso.

Las PBMC se descongelan en un baño a 37°C, y tras 3 lavados con PBS 1X se resuspenden en medio RPMI1640 (BioWhittaker-Lonza) suplementado con 10% de SBF, 1% de penicilina/estreptomicina y 2,2% L-Glutamina.

4.6 EVALUACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO DE CMM

Después de obtener un 100% de confluencia de las CMM al finalizar el proceso de aislamiento (P#0) y el segundo pase (P#2), se determina la expresión de los marcadores de superficie mediante los anticuerpos monoclonales: CD45-FITC (BD PharmingenTM), CD166-PE, CD80-AL647, CD31-FITC, CD105-FITC (Immunostep Diagnostics), CD34-PE, CD73-PE, CD90-AL647, HLA-I-PE y HLA-DR-FITC (AbD Serotec).

Para la realización de la citometría de flujo se utilizan 200.000 células/marcaje distribuidas en tubos de poliestireno de 5ml (BD Falcon). Una vez recogidas las células se lavan en 3ml de buffer de citometría (PBS 1X con 0,5% de Albumina de Suero Bovino (BSA) (Sigma-Aldrich) y 2mM EDTA (Sigma-Aldrich)) a 1500 rpm durante 10 minutos, eliminando el sobrenadante de cada tubo por inversión. Las células se incuban con los anticuerpos durante 20 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente; y transcurrida esta incubación, las células se lavan a 1500 rpm durante 10 minutos con buffer de citometría. Al completar el marcaje en el último lavado las células se resuspenden en 100 µl de buffer de citometría. Para el estudio del inmunofenotipado las células se adquieren en un citómetro de flujo FACSCalibur BD, y los datos son analizados con el software Paint a Gate.

4.7 DIFERENCIACIÓN TRILINEAR DE CMM

La diferenciación de las CMM en osteocitos, adipocitos y condrocitos se realizó entre el primer y quinto pase después de la determinación del inmunofenotipo.

- **Diferenciación osteogénica:**

La diferenciación osteogénica se realiza cultivando 10.000 células en un pocillo de 2cm² con un volumen de 1ml de medio alfa-MEM suplementado con 10% de SAFC, 1% de penicilina estreptomicina y L- Glutamina, hasta obtener una confluencia del 80%. En este momento el medio de cultivo suplementado, se cambia por medio de cultivo para diferenciación osteogénica que consiste en alfa- MEM, 10% de SBF, dexametasona 1mM, ascorbato 0,2mM y 10mg/ml de glicerol 2-fosfato. Transcurridas 3 semanas se realiza la evaluación de la diferenciación por cambio morfológico de las células (forma cúbica y deposición de calcio) observado en el microscopio y mediante la determinación de Hidroxiapatita inorgánica (HA) (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) principal compuesto de los depósitos de calcio, usando el kit OsteoImage Mineralization Assay (Lonza) mediante microscopía confocal. Para la determinación de HA se fijan las células con etanol durante 20 minutos y se lavan dos veces con buffer de lavado 1X. Se añade Staining reagent diluido 1:100 e incubamos durante 30 minutos a temperatura ambiente protegiendolo de la luz. Transcurrido el tiempo de lavan las células 3 veces dejando el buffer en el pocillo 5 minutos entre lavado y lavado. Finalmente las células se resuspenden en buffer de lavado y se observa la fluorescencia en el microscopio confocal Leica SP5.

- **Diferenciación adipogénica:**

La adipogénesis se induce cultivando 5.000 células/cm² en alfa-MEM suplementado hasta obtener una confluencia del 100%, cuando el medio de cultivo suplementado se reemplaza por medio de inducción adipogénica; que consiste en alfa-MEM, 10% de SBF, dexametasona 1mM, isobutilmetilxantina 0,5mM, insulina 10mg/ml e indometacina 200mM. A los 3-4 días, este medio se reemplaza por medio de mantenimiento adipogénico que consiste en alfa-MEM, 10% SBF y 10mg/ml de insulina. Transcurridos 3-4 días, el medio de mantenimiento se sustituye por medio de inducción adipogénica consecutivamente hasta completar 3 ciclos de inducción/mantenimiento. Al terminar el tercer ciclo las células se cultivan durante 7 días en medio de mantenimiento.

La diferenciación se evalúa después de 4 semanas de cultivo mediante la coloración de las vacuolas lipídicas intracelulares con aceite rojo O y por cambio morfológico de las células debido a la acumulación de vacuolas lipídicas en el citoplasma de las células observado en el microscopio.

Para la coloración con aceite rojo O las células se fijan con metanol duante 10 minutos, se realizan 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X y se adiciona la solución de acite rojo O (Adipo Red -Lonza) al

0,35% y se incuba durante 30 minutos. Después, se retira el colorante y las células se lavan de nuevo con PBS 1X; dejándolas en el último lavado resuspendidas en PBS. En el microscopio de fluorescencia se observaron las vacuolas lipídicas teñidas de rojo dentro de las células.

- **Diferenciación condrogénica:**

La diferenciación condrogénica se realiza cultivando las células a 5.000 células/cm² en alfa-MEM suplementado, hasta obtener una confluencia del 80%, después de esto el medio de cultivo suplementado se reemplaza por medio de inducción condrogénica que consiste en alfa-MEM, 10% de SBF, dexametasona 100nM, ascorbato 0,2mM y β -GP 10mM.

Para comprobar la diferenciación de las CMM en condroblastos, las células se fijan en etanol durante 10 minutos y posteriormente se realizan 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X. Las células se incuban durante con el anticuerpo de colágeno tipo II (Abcam) diluido 1:50 en PBS-BSA 0,1% o/n. Tras esto, se llevan a cabo 3 lavados con PBS 1x de las muestras y se incuban con el anticuerpo secundario durante 1 hora (anti rabbit Alexa 488 – Invitrogene) a una dilución 1:500 en PBS. En el microscopio confocal se observó la formación de matriz extracelular mediante el marcaje de colágeno.

4.8 ENSAYO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC)

Sembramos las células a una concentración de 10 células/cm² y las mantenemos durante 15 días en cultivo cambiando el medio cada 3-4 días. Pasado este periodo de tiempo las células se lavan con PBS 1X y se fijan con metanol durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavan con PBS 1X para posteriormente teñirlas con cristal Violeta al 0,2% durante 45 minutos a temperatura ambiente. Para finalizar se lavan los pocillos 3 veces con H₂O MilliQ y se dejan secar al aire. Se cuentan las colonias formadas representando los resultados como Número de Colonias (Nº Colonias).

4.9 ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN

Para analizar el efecto de las CMM sobre la proliferación de las células T con estímulo inespecífico y frente a autoantígenos se utilizaron PBMC de donantes sanos y células encefalíticas de ratón.

- **MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheniltetrazolium bromide)**

Para los ensayos de análisis de la capacidad inmunosupresora de las CMM, se preparan cocultivos de PBMC (2,5x10⁵ células/pocillo) y células encefalíticas de ratón (2,5x10⁵ células/pocillo) con CMM (1,25x10⁴ células/pocillo) en 200 μ l en placa multipocillo (ratio 1:20). Estos cocultivos se estimulan con PHA a 20 μ g/ml para las PBMC y con 25 μ g/ml MOG₃₅₋₅₅ para las células encefalíticas. Cada muestra se ensaya por cuadruplicado. El tiempo de incubación es de 72

horas. Para cuantificar la producción de interleuquinas, antes de añadir el MTT (Sigma-Aldrich) a los cultivos, se retiran 100µl de sobrenadante para utilizar en el ensayo de ELISA. Para el ensayo colorimétrico de MTT, se siguió el método descrito por Mosmann et al 1983. Los datos de absorbancia se obtienen en un lector de microplacas Multiskan Ex (Thermo Scientific) a 570nm.

4.10 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE FACTORES NEUROTROFICOS E INTERLEUQUINAS (ELISA)

- **Interleuquinas**

Los sobrenadantes de los cultivos empleados para la proliferación por el método colorimétrico de MTT, fueron utilizados para evaluar el efecto de las CMM sobre la producción de las citoquinas IL-4, IL-6, IL-10 e IFN-γ en las PBMC, siguiendo las recomendaciones de fabricantes de los sets específicos para la detección de IL-4, IL-6, IL-10 e IFN-γ (Diaclone).

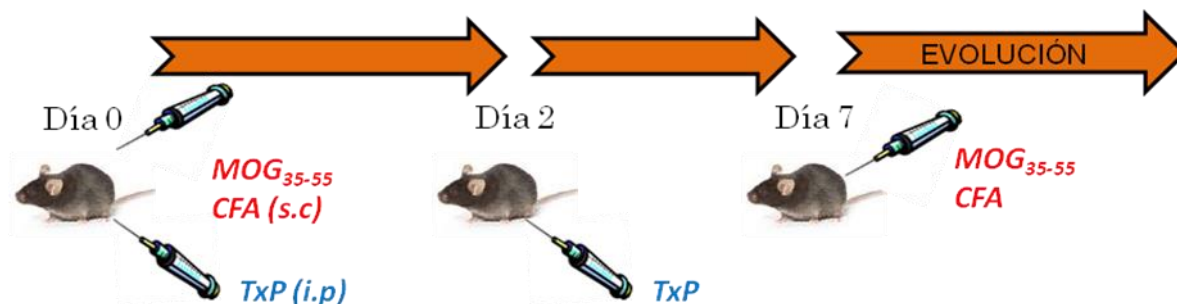
- **Factores neurotróficos**

Los sobrenadantes de los cultivos de CMM a una concentración de 10.000 células/cm² durante 72 horas fueron utilizados para evaluar la producción del factor neurotrófico NGF (Nerve Growth Factor) por las CMM, utilizando el set de detección de NGF (Promega) y siguiendo las recomendaciones del fabricante.

4.11 INDUCCIÓN ACTIVA DE LA EAE

El estudio con animales fue previamente aceptado por el comité ético de bienestar animal del Hospital Universitario Puerta de Hierro, siguiendo estrictamente toda la normativa vigente sobre el uso de animales con fines de investigación (RD53/2013 y la Directiva 2010/63/UE).

Para la inducción de EAE activa se utilizan ratones hembra C57/BL6 a partir de 8 semanas y se inoculan por vía subcutánea (s.c) con 0,2ml de una solución con 0,1ml de Adyuvante completo de Freund (CFA), que consiste en adyuvante incompleto de Freund (IFA) (Sigma-Aldrich) suplementado con 1mg/ml de micobacteria tuberculosa cepa H37Ra (Difco), y 250µg de MOG₃₅₋₅₅ (Bionova), diluido en un volumen similar de PBS. La administración se lleva a cabo en dos puntos de los flancos (en un flanco el día de la inmunización y en el otro flanco 7 días después de la inmunización (DPI)). A esto se añaden 500ng de toxina pertussis (TxP) (Sigma-Aldrich) en 0,2ml de PBS que se inyecta de forma i.p el día de la inoculación y 48 horas más tarde. El proceso de inmunización se resume en la figura que se presenta a continuación.



La evaluación de la enfermedad clínica, se lleva a cabo mediante la aplicación de escalas conocidas de 0 a 6 puntos y mediante la evaluación del peso. Los ratones control se inoculan siguiendo el protocolo anterior, pero sin incluir MOG₃₅₋₅₅.

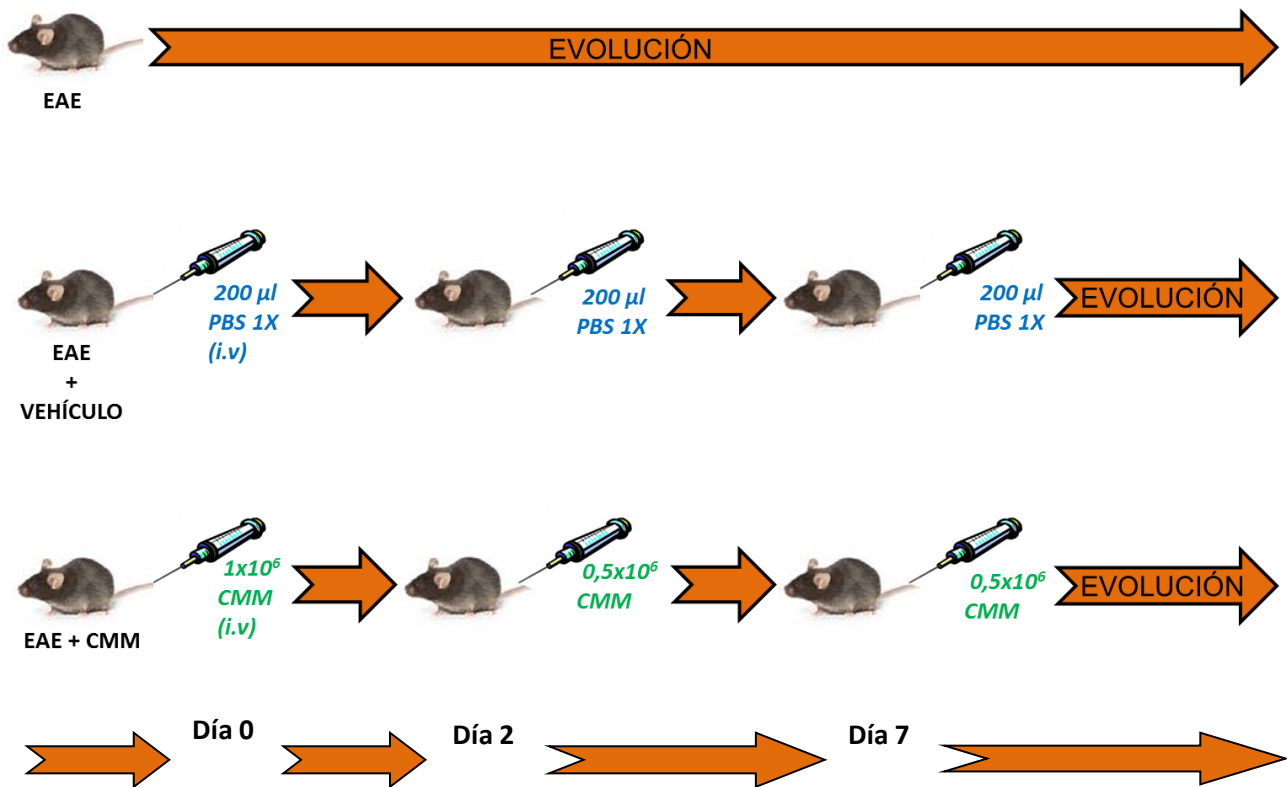
- **Valoración de los signos clínicos:**

Los signos de la EAE se valoran en función a la siguiente escala: 0 - ausencia de signos clínicos; 1 - pérdida parcial del tono de la cola (zona distal); 2 - pérdida total de fuerza en la cola; 3 - paraparesia de una o ambas extremidades traseras; 4 - parálisis parcial en las extremidades traseras; 5 - paraplejia y 6 - moribundo o muerte por EAE.

- **Tratamientos de los ratones EAE con CMM:**

Los ratones EAE inmunizados se dividen en distintos grupos en doble ciego: EAE control, EAE vehículo, EAE tratados con CMM de controles y EAE tratados con CMM de pacientes de EM.

- Los ratones del grupo EAE control son ratones inmunizados como se indica anteriormente, que no presentan ningún tipo de tratamiento y son usados como control de la enfermedad.
- Los ratones EAE vehículo son inoculados con 200µl de PBS 1X por vía i.v cada día de tratamiento.
- Los grupos de ratones EAE tratados con CMM se dividen a su vez conforme a la procedencia de las células (controles sanos o pacientes). Los ratones de estos grupos son inoculados con 2×10^6 de CMM por vía i.v, administradas en tres dosis de 1×10^6 , $0,5 \times 10^6$ y $0,5 \times 10^6$ de células, distribuidas en los días 0 (D0), 2 (D2) y 7 (D7) posteriores a la inmunización, respectivamente. Las CMM administradas, son procedentes de controles sanos (EAE + CMM Controles) y pacientes (EAE + CMM Pacientes). En cada dosis las células quedan resuspendidas en PBS 1X en un volumen de 200µl.



4.12 HISTOLOGÍA

El análisis histopatológico de los ratones se realiza en la médula espinal de los diferentes grupos experimentales. Para ello, los ratones se anestesian con Sevoflurano (Sevorane) y se sacrifican el día 32 PI por perfusión intracardiaca con PBS para proceder a la extracción de las columnas vertebrales. Para aislar la médula espinal se rompe cuidadosamente cada vertebra de la columna. Posteriormente, las muestras se fijan en paraformaldehído al 4% (Panreac) durante 24-48 horas a 4°C y tras 3 lavados con PBS 1X, el tejido es equilibrado en sacarosa. Para evitar el choque osmótico se prepara una batería de sacarosas en la que se va aumentando de forma progresiva la concentración (Sacarosa al 10% 1 hora, al 20% 2 horas y al 30% o/n). Después de extensos lavados en PBS 1x, las médulas se separan en las zonas lumbar y cervical, y el tejido se incluye en una resina (OCT: Optimal Cutting Temperature de Tissue-Tek^R) sumergido rápidamente en isopentano con nieve carbónica y almacenado a -80° C hasta su procesamiento.

4.13 INMUNOFUORESCENCIA

- **Valoración de la infiltración, desmielinización y el daño axonal**

Se realizan cortes seriados de la zona lumbar de las médulas (previamente fijadas e incluidas en OCT), de 20 micras de espesor en criostato (Leica) a -20°C. Los cortes se colocan en portaobjetos, preparados para fijar criomuestras, que se lavan en PBS 1X y se incuban con NH₄CL para eliminar autofluorescencia. Las muestras se permeabilizan mediante PBS 1X con 0,5% Tween (BioRad) y se incuban durante 10 minutos con PBS 1X que contiene 10% de suero de cabra, para eliminar las posibles uniones inespecíficas. Posteriormente, las muestras se incuban con tres pares de

anticuerpos: SMI32 (1:1000) y MBP (1:200); CD3 (1:20) y CB₂ (1:10); y F4/80 (1:10) y CB₂ (1:10) (Abcam) durante 1 hora. Tras esto, se llevan a cabo 3 lavados con PBS 1X de las muestras y se incuban con el anticuerpo secundario durante 45 minutos (anti mouse Alexa 488 and anti rabbit 546 - Invitrogene). Por último, las muestras se incuban con To-Pro (marcador de núcleos) durante 10 minutos y se lavan con PBS y H₂O y se montan los portaobjetos con aceite de montaje (Thermo). Las muestras se estudian en un microscopio confocal de fluorescencia.

- **Análisis de CB₁ y CB₂ en las CMM**

Se cultivan las células en una placa de 24 pocillos a una concentración de 5.000 células /cm² durante 24 horas para que se adhieran al plástico. Se retira el medio y se lava la monocapa celular repetidas veces con PBS 1X para eliminar los restos de suero que puedan interferir en el marcaje. Entonces, se fijan las células con metanol durante 10 minutos a temperatura ambiente. Nuevamente, se lavan las células con PBS 1X durante 5 minutos y se incuban 10 minutos con NH₄Cl. Para permeabilizar las células, se realiza una incubación de 10 minutos con PBS 1X - Tween 0,1% y se bloquean las inespecificidades con PBS 1X - BSA 5% durante 30 minutos. Posteriormente, las células se marcan con los anticuerpos primarios de CB₁ (Abcam) y CB₂ (Abcam) diluidos 1:50 o/n a 4°C en oscuridad y, tras 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X, se incuban durante 1 hora con el anticuerpo Anti Rabbit 488 (Invitrogen) diluido 1:500. Por último, las células se lavan 3 veces durante 5 minutos con PBS 1X, se incuban con To-Pro durante 10 minutos y, tras un último lavado en PBS, se resuspenden en H₂O para su estudio por microscopía confocal.

Se sigue el mismo procedimiento con las células M213-20 procedentes del estriado de rata (control negativo para CB₁ y CB₂), células PC12 procedentes de médula adrenal de rata (control positivo de CB₁) y HT29-CB₂ que son hepatocitos transfectados con una construcción que sobreexpresa CB₂ (control positivo de CB₂).

Para los controles negativos, las muestras son marcadas únicamente con el anticuerpo secundario en cada caso.

4.15 TINCIÓN DE HEMATOXILINA Y EOSINA

Esta tinción se realiza en los criocortes de las zonas lumbares de las médulas de los distintos grupos experimentales de ratones. Para ello, se deja descongelar los portaobjetos con las muestras durante 5 minutos y tras dos lavados en H₂O, las muestras se incuban en Hematoxilina de Harris por 45 segundos a temperatura ambiente. Tras un lavado con H₂O, las muestras se incubaron con eosina durante 15 segundos e inmediatamente se procede a la deshidratación de las muestras sumergiéndolas en una batería de alcoholes en aumento de graduación: 2 inmersiones en etanol al 96%, 2 inmersiones en etanol absoluto y 2 inmersiones en Xilol. Por último, se montan los portaobjetos con medio de montaje o glicerol.

4.16 CITOMETRÍA DE FLUJO

Para el marcaje de CB₁ y CB₂ en superficie e intracelular se utilizan 200.000 células/marcaje distribuidas en tubos de poliestireno de 5ml (BD Falcon). Una vez recogidas las células se lavan en 3 ml de buffer de citometría (PBS 1X con 0,5% BSA y 2mM EDTA) a 1500 rpm durante 10 minutos, eliminando el sobrenadante de cada tubo por inversión. Se añade suero de ratón (Linus) durante 5 minutos para eliminar uniones inespecíficas y los marcadores de superficie: CD90-FITC (BD Bioscience) para CMM y CD19-FITC (BD Bioscience), CD56-APC (AbD Serotec) y CD3-PerCP.Cy5 (BD Bioscience) para marcar células B, NK y T respectivamente en PBMC, durante 20 minutos en oscuridad.

- **Marcaje en superficie**

Se añaden los anticuerpos primarios de CB₁ (ABR) y CB₂ (ABR) junto con los marcadores de superficie durante 20 minutos en oscuridad. Después, se lavan las células con buffer de citometría a 1500 rpm durante 10 minutos. Tras esto, se añade el anticuerpo secundario para CB₁ y CB₂ marcado con PE (Anti-Rabbit Jackson ImmunoResearch Laboratories, INC) durante 20 minutos en oscuridad; y se realiza el último lavado de las células y se resuspenden en buffer de citometría. Antes de pasar las células por el citómetro, se añade a las muestras Anexina V-FITC (BD Pharmingen™) para ver la viabilidad de las mismas.

- **Marcaje intracelular**

Las células se fijan y permeabilizan usando el kit de permeabilización celular FIX&PERM^R (ADG Bio Research GmbH) siguiendo las instrucciones del suministrador, se añade suero de ratón durante 5 minutos y los anticuerpos primarios de CB₁ y CB₂ durante 20 minutos en oscuridad y se lavan las células a 1500 rpm durante 10 minutos. Tras esto, se les añade el anticuerpo secundario para CB₁ y CB₂ marcado con PE (Anti-Rabbit Jackson ImmunoResearch Laboratories, INC) durante 20 minutos en oscuridad y tras un último lavado, se resuspenden en buffer de citometría.

En ambos casos, las células se adquieren en un citómetro de flujo FACSsort con el programa informático "CELLQuest" y se analizan los resultados con el programa Paint a Gate.

Para el control de isotipos marcamos las muestras con los anticuerpos marcados de forma directa por separado (cada color por separado), y los anticuerpos secundarios en el caso del marcaje indirecto. También se analizan en el citómetro, las células sin marcar, para ver la autofluorescencia.

4.17 PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

Para el análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa se tripsinizan y recogen las CMM cultivadas hasta una confluencia del 90%, y se resuspenden en trizol (TRI REAGENT[®]- Molecular Research Center, Inc) para almacenarlas a -20°C hasta su procesamiento. Seguidamente se realiza una extracción de ARN (Rneasy Mini Kit, Qiagen) siguiendo las instrucciones del suministrador. El ARN se retrotranscribe a ADNc usando el kit GeneAmp gold RNA PCR Core Kit para RT-PCR (PE Biosystems).

La PCR cuantitativa a tiempo real se realiza en el LightCycler 480 (Roche Diagnostics) usando el Kit LightCycler 480 SYBER Green I Master (Roche Diagnostics) o LightCycler 480 Probes Master (Roche Applied Science) de acuerdo a las sondas o primers usados para la amplificación.

En el caso del housekeeping se utilizan varios genes, el SDHA (succinate dehydrogenase complex subunit A) y GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), sin embargo, debido al elevado valor de las muestras, se decide realizar los experimentos sólo con uno de ellos, en este caso SDHA.

Los primers usados para CB₂ y el gen de referencia, SDHA son los siguientes:

CB₂ Forward: 5' AGCCACCCACAACACAACC 3';

CB₂ Reverse: 5' GAGCCATTGGCTATCTCTGTC 3';

SDHA Forward: 5' TGGGAACAAGAGGGCATCTG 3';

SDHA Reverse: 5' CCACCACTGCATCAAATTCATG 3'

Para analizar la expresión de CB₁ y FAAH se usan sets de primers con sondas, altamente específicos (sondas Universal Probe Library (UPL) de Roche Applied Science): CB₁ (ID: 104051), FAAH (ID: 115042) y SDHA (ID: 102136).

Para analizar la expresión de CB₂ y SDHA, se obtiene el ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) de las células de estudio y se amplifican por triplicado con 4µl de ADNc, 5µl de SYBER Green (Kit LightCycler 480 SYBER Green I Master) y 0,5µl de cada primer a una concentración de 10µM, siendo el volumen final de la mezcla en cada pocillo de 10µl. Para CB₁ y FAAH, el ADNc se amplifica usando triplicados con 5µl de ADNc, 10µl de Probes Master (Kit LightCycler 480 Probes Master) y 1µl de UPL conteniendo la mezcla de primers (8pmol de cada primer) y sondas para un volumen final de la mezcla de 20µl por pocillo. Como control negativo para cada primer y sonda se usa el agua estéril.

La reacción de PCR se incubó primero a 95°C durante 10 minutos, seguido de 45 ciclos de 10 segundos a 95°C y 30 segundos a 59°C (CB₂) o 60°C (CB₁ y FAAH) y con un proceso de extensión de 1 segundo a 72°C.

La cuantificación relativa de las muestras se realizó con los valores Ct detectados de los genes diana (CB₁, CB₂ y FAAH) versus los valores del gen housekeeping (SDHA), transformándolos en ratios por el método 2- $\Delta\Delta$ Ct (LightCycler 480 Version 1.2 Software, Roche Diagnostics)

4.18 TRATAMIENTOS CON CANNABINOIDES *IN VITRO*

Las CMM o, en su caso, los cocultivos de CMM con PBMC y células encefalíticas fueron incubadas con los compuestos o el vehículo durante el tiempo indicado en cada ensayo. Los cannabinoides exógenos, WIN y CBD (Tocris), fueron conservados a -20°C en una solución Stock de 10mM en DMSO y posteriormente diluidos a una concentración final de 1 y 5 μ M respectivamente en medio de cultivo. El cannabinoide endógeno, AEA (Tocris), fue conservado a -20°C en una solución Stock de 10mM en Etanol y finalmente diluida a una concentración final de 5 μ M en medio de cultivo.

4.19 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para los experimentos tanto *in vitro* como *in vivo*, la normalidad de los datos se analiza usando el test de Shapiro-Wilks. El análisis de los resultados se lleva a cabo mediante un contraste o comparativa entre grupos que siguen una distribución anormal mediante la prueba no paramétrica U Mann-Whitney que compara 2 muestras independientes; o Kruskal-Wallis cuando se trata de más de dos muestras independientes para comparar. Se considera que existen diferencias significativas con valores de p menores de 0,05.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 OBTENCIÓN DE CMM DE MO DE CONTROLES Y PACIENTES DE EM

- Selección de pacientes y controles

Se reclutaron un total de 12 individuos para la extracción de médula ósea. De las muestras de médula obtenidas, se emplearon cuatro muestras de individuos sin enfermedades autoinmunes, como controles sanos, y ocho muestras procedentes de pacientes de esclerosis múltiple, de las que se excluyeron dos casos por anemia ferropénica y hepatitis B, tras el análisis serológico y bioquímico de las muestras. Los datos de los individuos se recogen en la **tabla 1**, detallada a continuación.

Muestra	Sexo	Edad (años)	Dx (años)	Forma EM	EDSS	ARR	Lesiones nuevas desde Dx	Tratamientos previos
Control 1	Mujer	52	-	-	-	-	-	-
Control 2	Varón	50	-	-	-	-	-	-
Control 3	Mujer	61	-	-	-	-	-	-
Control 4	Mujer	56	-	-	-	-	-	-
EM 1	Varón	48	24	SP	5	0,7	0	Rebif 44 (2000-2007)
EM 2	Mujer	36	2	RR	1	0,25	0	Metilprednisolona 2011
EM 3	Varón	36	6	SP	4	0,36	4	Betaferón (2007-2013)
EM 4	Mujer	58	13	SP	6	0,5	0	Betaferón (2000-2009)
EM 5	Mujer	48	8	SP	7,5	0,5	0	Rebif 22 (2006-2009) Tysabri (2009-2011) Copaxone (2011-2012)
EM 6	Mujer	50	19	RR	2	0,15	0	-

Tabla 1. Datos clínicos de controles sanos y pacientes de EM. Se detalla la sexo, edad, años diagnosticado (Dx), forma de EM (SP, secundaria progresiva; RR, remitente recurrente), escala expandida del estado de discapacidad (EDSS, Expanded Disability Status Scale), tasa anualizada de recaídas (ARR, Accounting Rate of Return); lesiones nuevas desde el diagnóstico y tratamiento previo (fechas de duración de cada uno de ellos).

- **Aislamiento, cultivo y expansión de las CMM**

Del total de las 10 muestras de médula ósea procesadas, se lograron obtener células con morfología fibroblastoide, libre de patógenos, con una viabilidad de entre un 70 y 90%. Las características individuales de cada una de las muestras recolectadas se pueden observar en la **tabla 2** que se detalla a continuación.

Muestra	Volumen de muestra extraído	Recuento de células mononucleares en la muestra	Viabilidad P#0
Control 1	25 ml	805x10 ⁶	93%
Control 2	25 ml	841x10 ⁶	97%
Control 3	25 ml	1012x10 ⁶	92%
Control 4	25 ml	837x10 ⁶	90%
EM 1	40 ml	369.6x10 ⁶	92%
EM 2	35 ml	1508x10 ⁶	73%
EM 3	50 ml	3100x10 ⁶	90%
EM 4	50ml	>4000x10 ⁶	84%
EM 5	50ml	2350x10 ⁶	71%
EM 6	50ml	1024x10 ⁶	84%

Tabla 2. Datos de las muestras extraídas. Se detallan características, tales como el volumen de muestra extraído, el recuento de células mononucleares y la viabilidad de las CMM de MO en fase 0 (P#0) tanto de controles como de pacientes (EM).

5.2 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA, CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE COLONIAS (UFC) Y TRANSFORMACIÓN TRILINEAR DE LAS CMM

Para analizar si las CMM de controles y pacientes cumplían los tres criterios mínimos exigidos por la ISCT (morfología, fenotipo y diferenciación trilinear), o si presentaban alterada alguna de estas características, se cultivan las CMM hasta un máximo de 5 pases.

- **Morfología**

Durante los primeros 15 días de cultivo se observó mediante microscopía en contraste de fases, una morfología fibroblastoide típica de este tipo celular, tanto en pacientes como en controles sanos. Las células presentaron adherencia al plástico a los 2-3 días de su extracción llegando a confluencia a los 14-18 días en cultivo (**figura 1**).

No se observó ningún tipo de diferencia en el proceso de crecimiento ni de expansión entre CMM procedentes de controles sanos y pacientes de EM.

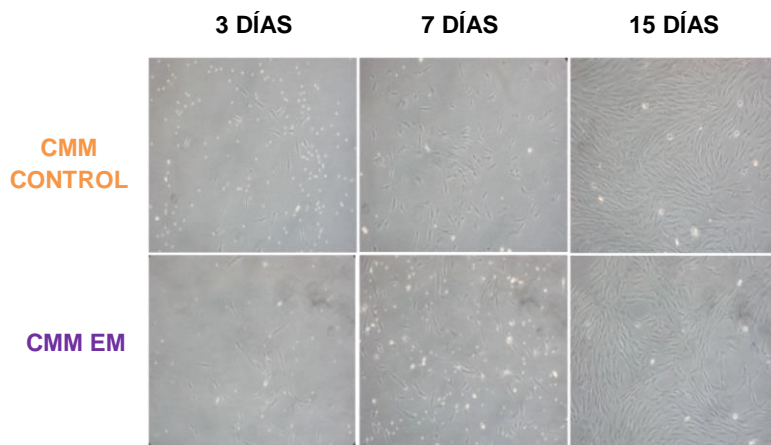


Figura 1. Morfología y expansión de las CMM. Imágenes secuenciales del cultivo de CMM de MO de un control sano y un paciente EM en P#0 durante 3, 7 y 15 días de su aislamiento. Imágenes de microscopía en contraste de fases (10x).

- **Inmunofenotipo**

Para determinar la expresión de antígenos hematopoyéticos (CD34 y CD45) y mesenquimales (CD31, CD73, CD80, CD90, CD105, CD166, HLA-I y HLA-II), se determinó la intensidad media de fluorescencia (IMF) de cada proteína antes de su primer pase de cultivo (P#0) mediante citometría de flujo.

En la **figura 2** se presentan las medias de las IMF para cada uno de los antígenos evaluados en las CMM de los controles y los pacientes de EM. Los resultados muestran que más del 96 % de las células analizadas expresan los antígenos CD73, CD90 CD105, CD166 y HLA-I, mientras que CD31, HLA-II, CD34 y CD45 presentan valores muy bajos.

También, se evaluó la posible variación en la expresión de los marcadores de superficie de las CMM de controles sanos y pacientes durante su expansión, comparando la IMF de cada proteína en el pase 0 (P#0) y tras el segundo pase (P#2) del cultivo. Como se presenta en la **figura 2**, se observó que el inmunofenotipo de las CMM no variaba en los pases estudiados.

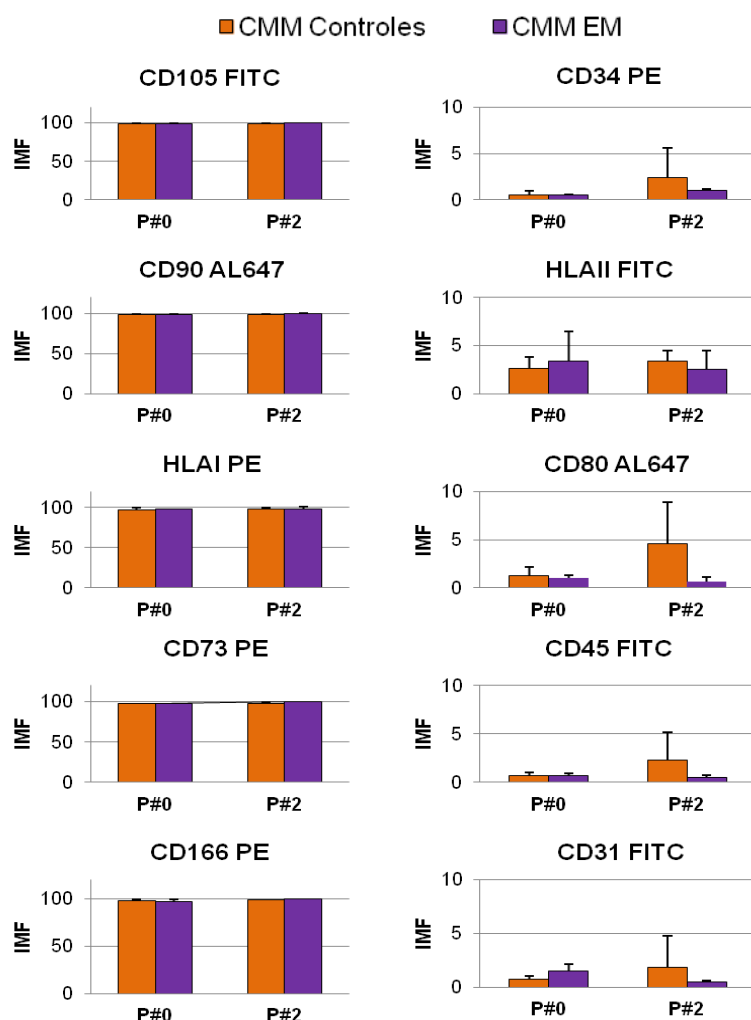


Figura 2. Caracterización fenotípica de las CMM en P#0 y P#2 del cultivo.

Medias de la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) para los marcadores de superficie positivos (CD105, CD90, HLAI, CD73 y CD166) y negativos (CD34, HLAII, CD80, CD45 y CD31) de CMM en muestras aisladas de controles (n=4) (naranja) y pacientes de EM (n=6) (morado) en P#0 y P#2. Los datos representan la media de n=3 experimentos independientes \pm Desvest.

Los resultados indican que las células de nuestro cultivo presentan el fenotipo establecido para CMM, asimismo, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los fenotipos de las CMM de controles y pacientes de EM. Por otro lado, se muestra que el fenotipo de las células es estable durante su expansión sin variar en los pases de cultivo.

- **Capacidad de formación de colonias (UFC)**

Una de las características de las CMM es su disposición en colonias aisladas, que posteriormente se unifican formando una monocapa. Por ello, evaluamos la capacidad de crecer como UFC de las CMM procedentes de controles y pacientes de EM.

En la **figura 3** se observa que las CMM de controles y pacientes de EM tras 15 días en cultivo, presentaron el mismo número de colonias teñidas con cristal violeta. Podemos concluir, que la capacidad para crecer como UFC, es una característica típica de las CMM independientemente de su procedencia (sano o paciente).

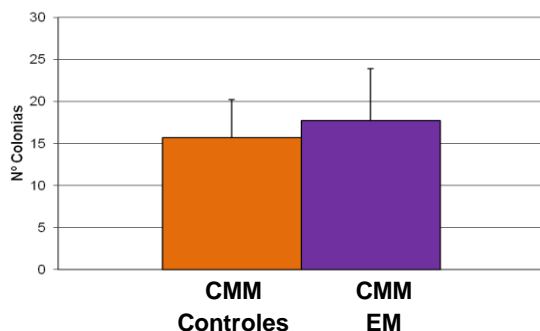


Figura 3. Cuantificación de UFC de CMM. Media del número de colonias formadas por CMM de controles (naranja) y pacientes de EM (morado) mediante el conteo de las colonias teñidas con cristal violeta. Los datos representan la media de n=6 experimentos independientes \pm Desvest.

- **Transformación trilinear (tejido adiposo, cartílago y hueso)**

Otra de las características esenciales de las CMM es su capacidad de diferenciación a tejido adiposo, óseo y cartílago. Para determinar si existe algún tipo de cambio en la multipotencialidad de las CMM de pacientes de EM con respecto a las células de controles, se llevaron a cabo los protocolos específicos para cada tipo celular, con CMM expandidas hasta un máximo de cinco pases.

En la **figura 4 (A-C)** se representan la IMF de los marcadores para adipocitos, osteocitos y condrocitos en células diferenciadas de controles y pacientes de EM. Como puede apreciarse, no se obtuvieron diferencias significativas entre las CMM de controles y pacientes de EM en la diferenciación hacia células de los linajes adipogénico (**4A**), osteogénico (**4B**) y condrogénico (**4C**).

La **figura 4A**, muestra que las CMM de los pacientes se diferenciaron a adipocitos del mismo modo que las células de controles. Como puede observarse en las imágenes, las células diferenciadas en adipocitos, de un control sano (**figura 4B**) y un paciente de EM (**figura 4C**), mostraron las vacuolas lipídicas características, teñidas de color rojo con aceite rojo O.

DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA

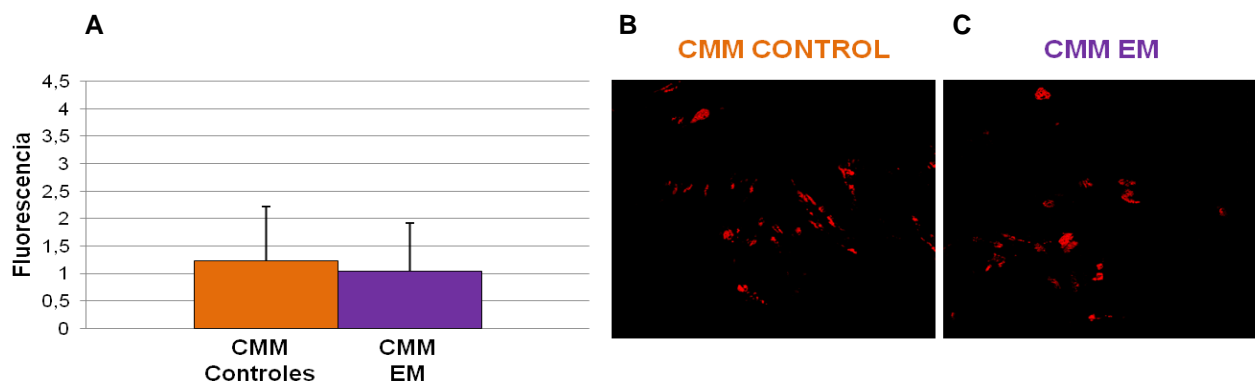


Figura 4. Diferenciación adipogénica de CMM. (A) Medias de la IMF de expresión de los marcadores de diferenciación a adipocitos de células de controles (n=4) (naranja) y pacientes de EM (n=6) (morado). Los datos representan la media de n=3 experimentos independientes \pm Desvest. (A-B) Imágenes de fluorescencia determinadas por microscopía confocal representando la capacidad de diferenciación adipogénica de las CMM de un control sano (B) y un paciente de EM (C). El marcaje utilizado es AdipoRed para adipocitos. Como control negativo se usan CMM en medio de cultivo estándar (células sin diferenciar).

Las CMM de controles y pacientes se diferenciaron en células de linaje osteogénico con la misma capacidad (figura 5A). En este caso las células se observan teñidas de color verde; demostrando la presencia de depósitos de calcio (HA inorgánica) como consecuencia de la actividad de la enzima fosfatasa alcalina en las células diferenciadas de controles (figura 5B) y pacientes de EM (figura 5C).

DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA

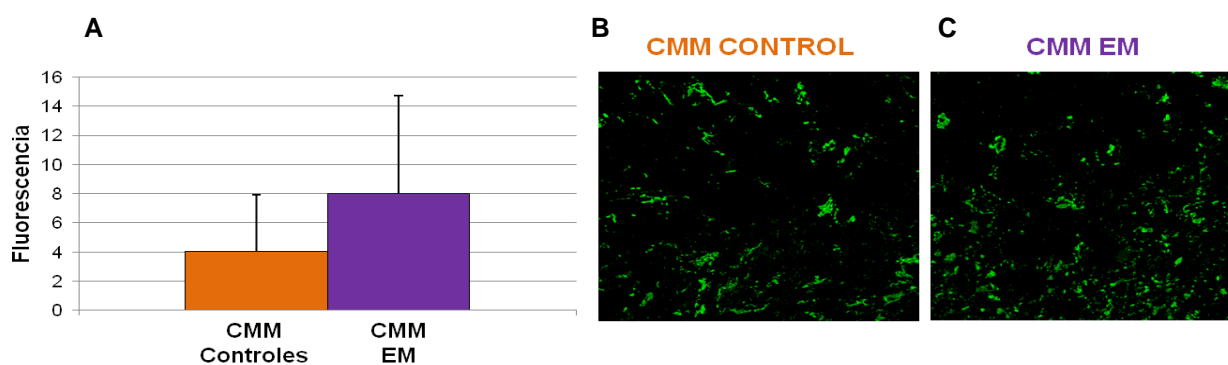


Figura 5. Diferenciación osteogénica de CMM. (A) Medias de la IMF de expresión de los marcadores de diferenciación a osteocitos de células de controles (n=4) (naranja) y pacientes de EM (n=6) (morado). Los datos representan la media de n=3 experimentos independientes \pm Desvest. (A-B) Imágenes de fluorescencia determinadas por microscopía confocal representando la capacidad de diferenciación osteogénica de las CMM de un control sano (B) y un paciente de EM (C). El marcaje utilizado es HA (Hidroxiapatita) para osteocitos. Como control negativo se usan CMM en medio de cultivo estándar (células sin diferenciar).

La diferenciación de las CMM a células de linaje condrogénico en cultivo de monocapa, fue demostrada mediante tinción con el anticuerpo de Colágeno tipo II no observando diferencias entre las células procedentes de sanos y pacientes (**figura 6A**). Las células se tiñeron de color verde indicando la producción de matriz extracelular en células de controles (**figura 6B**) y pacientes de EM (**figura 6C**).

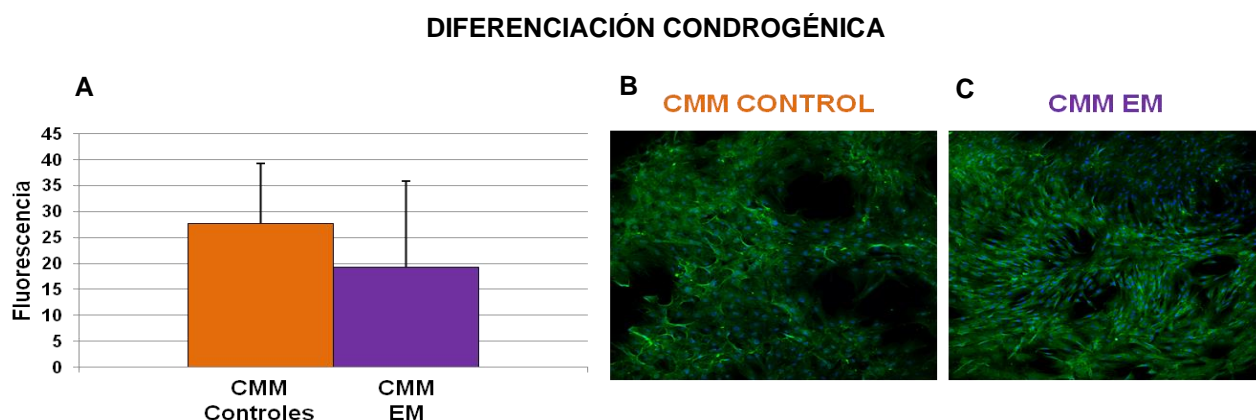


Figura 6. Diferenciación condrogénica de CMM. (A) Medias de la IMF de expresión de los marcadores de diferenciación a condrocitos de células de controles (n=4) (**naranja**) y pacientes de EM (n=6) (**morado**). Los datos representan la media de n=3 experimentos independientes \pm Desvest. (A-B) Imágenes de fluorescencia determinadas por microscopía confocal representando la capacidad de diferenciación condrogénica de las CMM de un control sano (B) y un paciente de EM (C). El marcaje utilizado es **Anti Colágeno tipo II** para condrocitos. Como control negativo se usan CMM en medio de cultivo estándar (células sin diferenciar).

Las CMM de pacientes de EM no presentan alterada su multipotencialidad; demostrando que poseen la misma capacidad diferenciadora, a los tres linajes estudiados, que las CMM obtenidas de controles sanos.

5.3 VALORACIÓN DE LA CAPACIDAD INMUNOMODULADORA Y LA PRODUCCIÓN DE FACTORES NEUROTROFICOS DE LAS CMM DE CONTROLES Y PACIENTES

- Valoración de la capacidad antiproliferativa

Se estudia la capacidad antiproliferativa de las CMM frente a PBMC y células encefalitógenas de ratones EAE.

- Efecto de las CMM de controles sanos y pacientes sobre la proliferación de las PBMC

Para valorar la capacidad antiproliferativa de las CMM de controles y pacientes; éstas células se cultivaron en presencia de PBMC de donantes sanos estimuladas a una ratio 1:20, previamente

seleccionado, donde se detectó una mayor disminución de la proliferación, analizado por MTT y CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) mediante citometría de flujo.

Como se muestra en la **figura 7**, las CMM de controles y pacientes disminuyeron significativamente la proliferación de las PBMC activadas, de individuos sanos, sin embargo no se observan diferencias significativas al compara las CMM de controles sanos y pacientes.

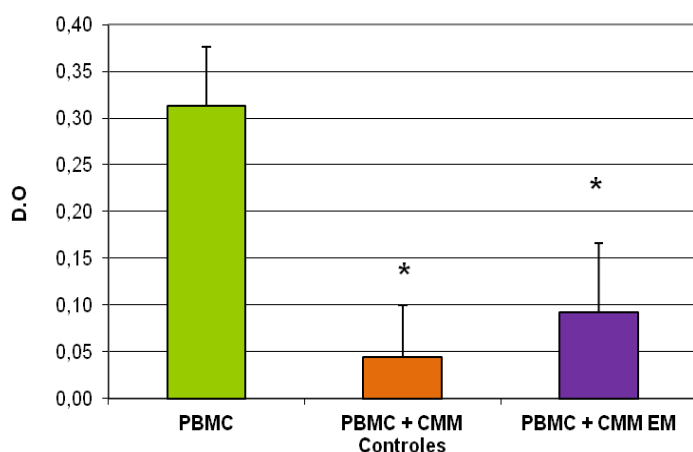


Figura 7. Proliferación de PBMC estimuladas en cocultivo con CMM de controles y pacientes de EM. Se determina por ensayo colorimétrico de MTT la proliferación de PBMC de donantes sanos estimuladas con PHA (20 µg/ml) en presencia de CMM de MO de controles sanos (n=4) (naranja) y pacientes de EM (n=6) (morado) durante 72 horas a una ratio 1:20 (CMMMO:PBMC). Los datos representan la media de n=3 experimentos independientes ± Desvest. *P<0.05 estadísticamente significativo.

Nuestros resultados muestran que la capacidad antiproliferativa de las CMM sobre las PBMC se produce de una forma dosis dependiente (ratio PBMC:CMM) ; sin embargo, es independiente de la procedencia de las CMM.

- Efecto de las CMM de pacientes sobre la proliferación de las PBMC heterólogas vs autólogas

Por otro lado, para estudiar más a fondo el potencial antiproliferativo de las CMM de pacientes de EM; se analizó el efecto de las CMM de un paciente sobre la proliferación de PBMC procedentes de un donante sano (heterólogas sanas) en comparación con PBMC procedentes del propio paciente de EM (autólogas) estimuladas mediante el ensayo colorimétrico de MTT.

Como puede observarse en la **figura 8**, el potencial antiproliferativo es exactamente el mismo en ambos casos. Las CMM de pacientes de EM, disminuyen la proliferación de las PBMC, independientemente de su procedencia, lo que podría indicar que las CMM de pacientes también podrían emplearse en tratamientos heterólogos.

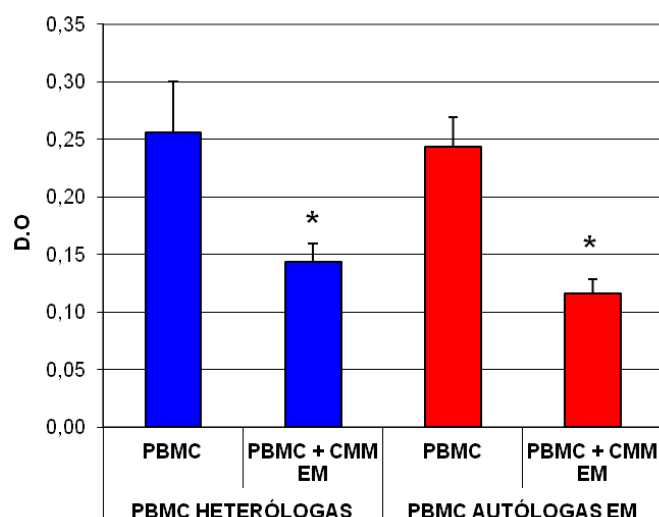


Figura 8. Proliferación de PBMC heterólogas y autólogas estimuladas en cocultivo con CMM de un paciente de EM. Se determina por ensayo colorimétrico de MTT la proliferación de PBMC de donantes sanos (**heterólogas**) y un paciente de EM (**autólogas**) estimuladas con 20 µg/ml de PHA en presencia de CMM del mismo paciente de EM durante 72 horas a una ratio 1:20 (CMM:PBMC). Los datos representan la media de n=3 experimentos independientes ± Desvest. *P<0.05 estadísticamente significativo.

▪ Efecto de las CMM de pacientes sobre la proliferación de las células encefalitógenas

Otro de los puntos que se pretende analizar, es el efecto de las CMM sobre la proliferación de células encefalitógenas de ratones EAE inducidos con el péptido MOG₃₅₋₅₅. Las células encefalitógenas son estimuladas con MOG₃₅₋₅₅ y cocultivadas con CMM de controles y pacientes en un ratio 1:20. La cuantificación de la proliferación se lleva a cabo mediante colorimetría con MTT.

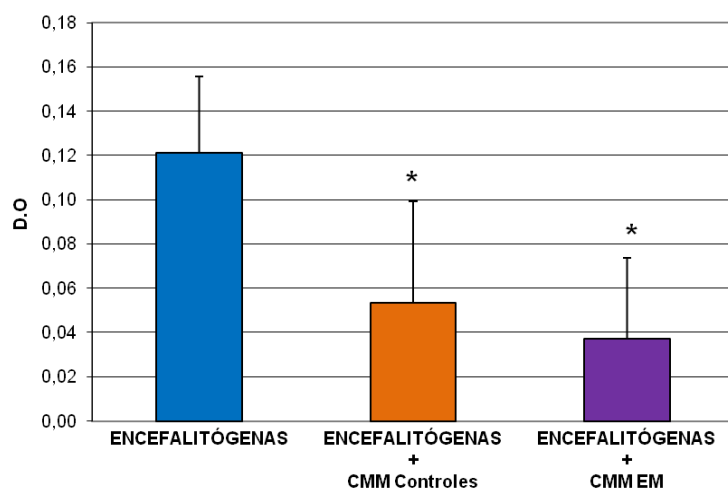


Figura 9. Proliferación de células encefalitógenas de ratón en cocultivo con CMM de controles y pacientes de EM. Se determina por ensayo colorimétrico de MTT la proliferación de **células encefalitógenas** de ratones EAE (inmunizados con el péptido MOG₃₅₋₅₅) estimuladas con **MOG** (25 µg/ml) en presencia de CMM de controles sanos (**naranja**) y pacientes de EM (**morado**) durante 72 horas a una ratio 1:20 (CMM:PBMC). Los datos representan la media de n=3 experimentos independientes ± Desvest. *P<0.05 estadísticamente

Tras 72 horas en cultivo puede observarse (**figura 9**) una disminución de la proliferación de las células encefalitógenas en presencia de CMM procedentes tanto de controles como de pacientes sin existir diferencias relacionadas con su procedencia.

• **Valoración de la capacidad inmunomoduladora de CMM sobre PBMC**

Tras demostrar el potencial antiproliferativo de las CMM sobre las PBMC, evaluamos su capacidad inmunomoduladora mediante el análisis de citoquinas de los sobrenadantes de las proliferaciones de las PBMC en presencia de las CMM de controles y pacientes durante 72 horas mediante el ensayo colorimétrico ELISA. Las citoquinas analizadas fueron IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-6.

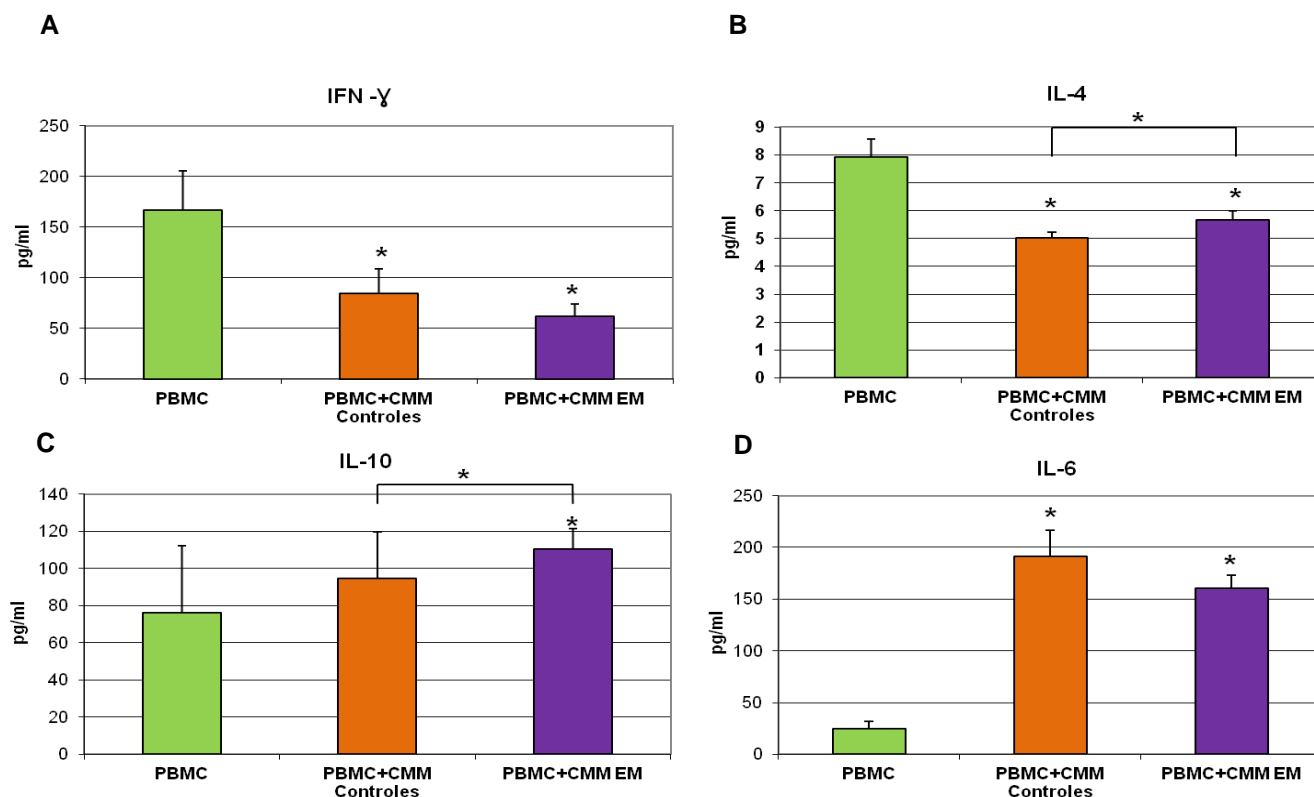


Figura 10. Análisis de citoquinas. Se analizan por el ensayo colorimétrico ELISA las citoquinas IFN-gamma (A), IL4 (B), IL10 (C) e IL6 (D) de sobrenadantes de **PBMC**, estimuladas con **PHA** (20 μ g/ml) en presencia de CMM de controles sanos (**naranja**) y pacientes de EM (**morado**) durante 72 horas a un ratio 1:20 (CMM:PBMC). Los datos representan n=3 experimentos independientes \pm Desvest. *P<0.05 estadísticamente significativo.

La producción de las citoquinas IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-6 por PBMC aumentó, en todos los casos, tras el estímulo con fitohemaglutinina (PHA). Las CMM, en ausencia de PBMC, presentan una producción de IFN- γ , IL-4 e IL-10 con valores muy bajos, sin mostrarse alterada en presencia de PHA. Sin embargo, las CMM producen IL-6 de forma constitutiva y, además, la concentración de esta citoquina, aumenta tras añadir PHA al medio, siendo superior a la producción de las PBMC estimuladas de forma independiente.

En la **figura 10** se muestra como la producción de las citoquinas IFN- γ (**A**) e IL-4 (**B**) por parte de las PBMC aumenta cuando son estimuladas con PHA, sin embargo, se encuentra disminuida en presencia de las CMM, lo que se correlaciona con la disminución de la proliferación de las PBMC.

Para IL-10 (**C**) detectamos una mayor producción en el cocultivo, lo que nos indica que las CMM podrían estar favoreciendo la producción de esta citoquina por parte de las PBMC, aunque su proliferación se vea disminuida. En cuanto a la citoquina IL-6 (**D**) observamos que su producción se ve favorecida tanto en PBMC como en CMM estimuladas con PHA. Además, la combinación en el cultivo de PBMC y CMM produce unos niveles de citoquina por encima de los producidos por las células de manera individual.

De todas las citoquinas analizadas, comparamos los resultados obtenidos en CMM de controles sanos y pacientes de EM. Como se muestra en la **figura 10**, la producción de la citoquina proinflamatoria, IFN- γ (**A**), se ve disminuida en el cocultivo independientemente de la procedencia de las CMM. Sin embargo, se detectan diferencias con las citoquinas anti inflamatorias IL-4 e IL-10; y la citoquina proinflamatoria IL-6. En el caso de IL-4 e IL-10, la presencia de CMM de pacientes tiene como consecuencia una mayor producción de la proteína en el cocultivo. En contraposición, la producción de IL-6 es menor en presencia de las CMM procedentes de pacientes.

- **Valoración de la producción del factor neurotrófico NGF en CMM de controles y pacientes**

NGF es un factor secretado por las CMM importante por su implicación en la supervivencia neuronal, la diferenciación de progenitores neurales y el crecimiento de neuritas, pudiendo prevenir el daño axonal producido durante la EM. Estudiamos el factor neurotrófico NGF en sobrenadantes de CMM de controles y pacientes de EM tras 72 horas en cultivo, mediante el ensayo colorimétrico ELISA.

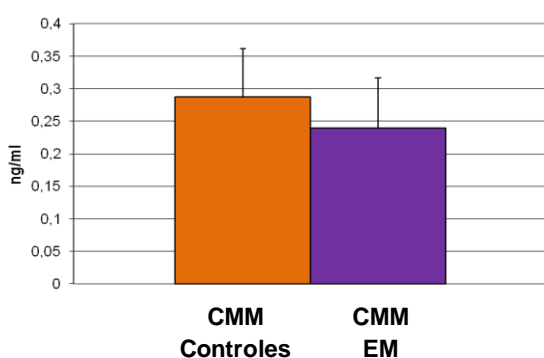


Figura 11. Producción del factor neurotrófico NGF por las CMM. Se analiza mediante el ensayo colorimétrico ELISA la producción de NGF en los sobrenadantes de los cultivos de CMM de controles sanos (n=4) (**naranja**) y pacientes de EM (n=6) (**morado**) durante 72 horas a una concentración inicial de 1×10^4 células/cm². Los datos representan la media de n=4 experimentos independientes \pm Desvest

Las CMM de pacientes de EM producen la proteína de NGF (**figura 11**) en niveles similares a las CMM de controles sanos. Las observaciones indican que las CMM de los pacientes de EM conservan las propiedades neurotróficas características de este tipo celular.

5.4 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON CMM DE CONTROLES Y PACIENTES DE EM EN EAE

• Modelo animal experimental

▪ Inducción de la EAE

En la literatura existe una alta variabilidad en el protocolo de inducción del modelo murino de EM. Para desarrollar nuestro modelo, evaluamos la EAE realizando modificaciones de diferentes variables que puedan influir en la inmunización de los ratones como son la cantidad de proteína (MOG) inoculada y el sexo de los ratones.

La mayoría de los protocolos comparten las mismas cantidades de M. Tuberculosis y Toxina Pertussis, pero la variable que más se modifica entre protocolos es la cantidad de péptido (MOG₃₅₋₅₅) inoculado.

Para poder desarrollar nuestro modelo murino de EAE, analizamos la influencia de las diferentes cantidades de proteína MOG presentes en el inóculo sobre la sintomatología de los ratones. Todos los ratones son inmunizados con 2mg de M. Tuberculosis, 1µg de Toxina Pertussis y diferentes cantidades de MOG₃₅₋₅₅ en un rango de 200 a 700µg de proteína total.

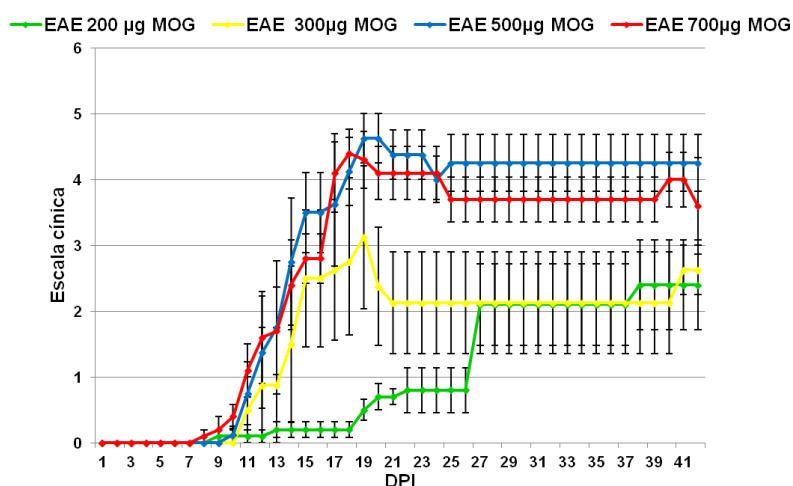


Figura 12. Modificación de la cantidad de MOG en la inducción de la EAE. La EAE se indujo por la inmunización con MOG₃₅₋₅₅ en ratones C57BL/6 usando distintas cantidades de proteína en el inóculo: **200µg MOG₃₅₋₅₅**, **300µg MOG₃₅₋₅₅**, **500µg MOG₃₅₋₅₅** y **700µg MOG₃₅₋₅₅**. Los signos clínicos se evaluaron como se describe en materiales y métodos. Los valores representan la media del grado clínico de cada grupo \pm SEM, n=5 ratones por grupo.

En la **figura 12** podemos observar que la inmunización con 200 y 300µg de MOG desarrolla un modelo mucho más heterogéneo y en el que no observamos una escala clínica suficiente para evaluar el daño axonal.

Entre 500 y 700µg observamos (**figura 12**) un desarrollo de signos suficientes para evaluar daño axonal con un modelo más homogéneo, aunque el aumento de la concentración de proteína no refleja ningún cambio en la escala clínica lo que nos permite alcanzar la sintomatología deseada inoculando 500µg de MOG₃₅₋₅₅.

La EM es una enfermedad con una frecuencia de dos a tres veces superior en mujeres, por ello una variable importante a tener en cuenta en nuestro modelo de EAE es el sexo de los ratones inmunizados. En relación a este tema hay controversia en la literatura.

Ratones machos y hembras de entre 6 y 8 semanas son inmunizados con 2mg de M. Tuberculosis, 1µg de Toxina Pertussis y 500µg de MOG₃₅₋₅₅.

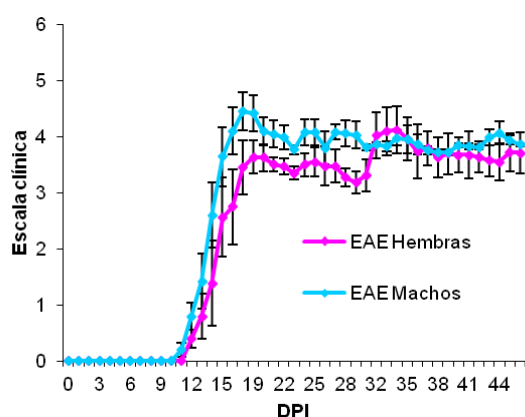


Figura 13. Influencia del género en la inducción de la EAE. La EAE se indujo por la inmunización con 500µg MOG₃₅₋₅₅ en ratones C57BL/6 usando distinto sexo: **EAE- Hembras** y **EAE- Machos**. Los signos clínicos se evaluaron como se describe en materiales y métodos. Los valores representan la media del grado clínico de cada grupo \pm SEM, n=5 ratones por grupo. El análisis de los resultados se realiza usando Mann-Whitney U test. * P<0.05.

En la **figura 13** podemos observar que la EAE, se desarrolla del mismo modo y alcanza el mismo grado en la escala clínica, tanto en machos como en hembras de la misma edad.

En la **figura 14** se muestra la estandarización de nuestro modelo animal de EAE. Hembras de la cepa C57BL/6 de entre 6 y 8 semanas de edad son inoculadas con 2mg de M. Tuberculosis, 1µg de Toxina Pertussis y 500µg MOG₃₅₋₅₅ totales como se describe en materiales y métodos.

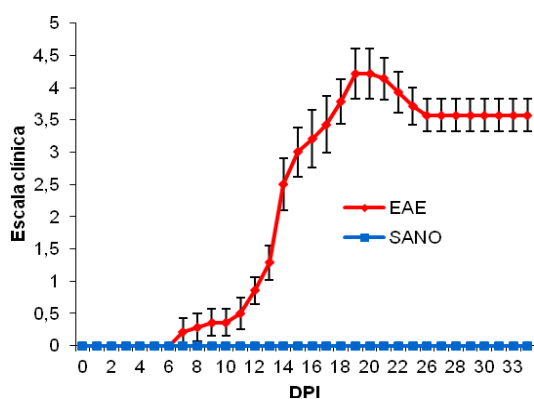


Figura 14. Estandarización del modelo de EAE. La EAE se indujo por la inmunización con 500µg MOG₃₅₋₅₅ en ratones hembra C57BL/6 entre 6-8 semanas de edad. Grupo 1: EAE y Grupo 2: Control Sano. Los signos clínicos se evaluaron como se describe en materiales y métodos. Los valores representan la media del grado clínico de cada grupo \pm SEM, n=5 ratones por grupo.

- **Evaluación del efecto de las CMM en ratones EAE**

En la literatura, se ha observado que el tratamiento de la EAE con CMM, disminuye los signos clínicos de la enfermedad, sin embargo, no existe ningún consenso en el protocolo a seguir, en cuanto a la vía de administración, el número de células, los días y la frecuencia de administración.

Con el objetivo de valorar el tratamiento con CMM en nuestro modelo de EAE, realizamos diferentes protocolos con CMM de controles sanos; comparando las vías de administración i.p e i.v e inoculando diferentes concentraciones de células (de 0.5×10^6 hasta 4×10^6), que fueron administradas en diferentes días del desarrollo de la EAE en una o varias infusiones (de una a seis infusiones diferentes). El grupo para comparar nuestros tratamientos será el de los animales EAE control, ya que, tras múltiples experimentos, no observamos ninguna diferencia en el comportamiento y evolución de la EAE entre los grupos control de EAE y los animales EAE tratados con el vehículo de las CMM (PBS 1X). De esta manera disminuimos el número de grupos y por lo tanto el número de animales utilizados en cada experimento.

Por ello, nuestros experimentos se centran en el tratamiento de los ratones con CMM administradas mediante las vías i.p e i.v. En ambas administraciones, los ratones no admitieron una concentración superior a los 2×10^6 células en una sola dosis. En el caso de varias administraciones, no se pudo superar el 1.5×10^6 células por infusión, pudiendo llegar a un total de 4×10^6 células administradas en varias infusiones.

Debido a que el momento de administración de las células, es un factor clave en el tratamiento de la EAE, comparamos el tratamiento por vía i.v con 2×10^6 células repartidas en dos infusiones de 1.5×10^6 y 0.5×10^6 células, que se administraron en los días 2 y 7 (días previos) o en los días 7 y 20 (días posteriores) posteriores al inicio de los signos clínicos, respectivamente. Como se muestra en la **figura 15**, no se observó reducción de los signos clínicos, tras el tratamiento de los animales en días previos (**A**) ni posteriores (**B**); sin embargo, se detecta una tendencia a la disminución cuando la administración de las células, se realiza en los días previos al inicio de los signos clínicos, poniendo de manifiesto la importancia del momento en el que se inicia el tratamiento, durante el desarrollo de la EAE.

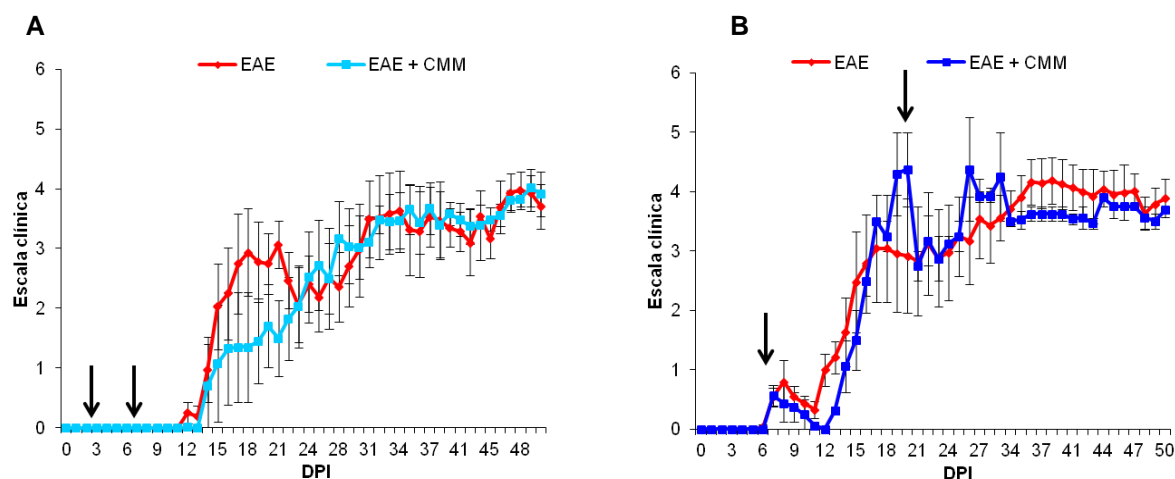


Figura 15. Efecto terapéutico de CMM en EAE. La EAE se indujo por la inmunización con MOG₃₅₋₅₅ en ratones C57BL/6. Los ratones se trataron por vía i.v con 2×10^6 de CMM divididas en dos administraciones de 1.5×10^6 y 0.5×10^6 células en 200 μ l de volumen final en los días 2 y 7 (A) y los días 7 y 20 (B), posteriores a la inmunización (DPI). Los signos clínicos se evaluaron como se describe en materiales y métodos. Las flechas negras indican la administración de CMM. Los valores representan la media del grado clínico de cada grupo \pm SEM, n=5 ratones por grupo. El análisis de los resultados se realiza usando Mann-Whitney U test. * $P < 0.05$ en comparación con ratones control de EAE.

Tras seleccionar nuestra ventana terapéutica en los primeros días del desarrollo de la EAE, comparamos la vía de administración de las células. Los ratones son tratados con un total de 2×10^6 CMM, administradas por vía i.v e i.p en los días 0, 2 y 7 DPI, y repartidas en tres dosis de 1×10^6 , 0.5×10^6 y 0.5×10^6 , respectivamente. En la **figura 16**, podemos observar como los ratones EAE tratados por vía i.v con 2×10^6 CMM (A) presentan una escala de discapacidad significativamente menor a los ratones EAE control (1.05 ± 0.35 frente a 4.24 ± 0.3 respectivamente) en el día de máximo grado de la EAE (17 DPI); sin embargo, los ratones inoculados con 2×10^6 CMM por vía i.p (B) no presentan diferencias con respecto al grupo EAE control (3.79 ± 0.04 frente a 3.63 ± 0.3 respectivamente). Cuando comparamos la escala de discapacidad de los ratones, en el día de máxima escala clínica (20 DPI); observamos que disminuye significativamente en los ratones EAE tratados con 2×10^6 CMM por vía i.v (C), mientras que por vía i.p (D) no observamos diferencias con respecto al grupo EAE control.

En cuanto a la vía i.p, obtuvimos una reducción de los signos clínicos, en el 40% de los tratamientos, por lo que descartamos esta vía de administración debido a la falta de reproducibilidad obtenida.

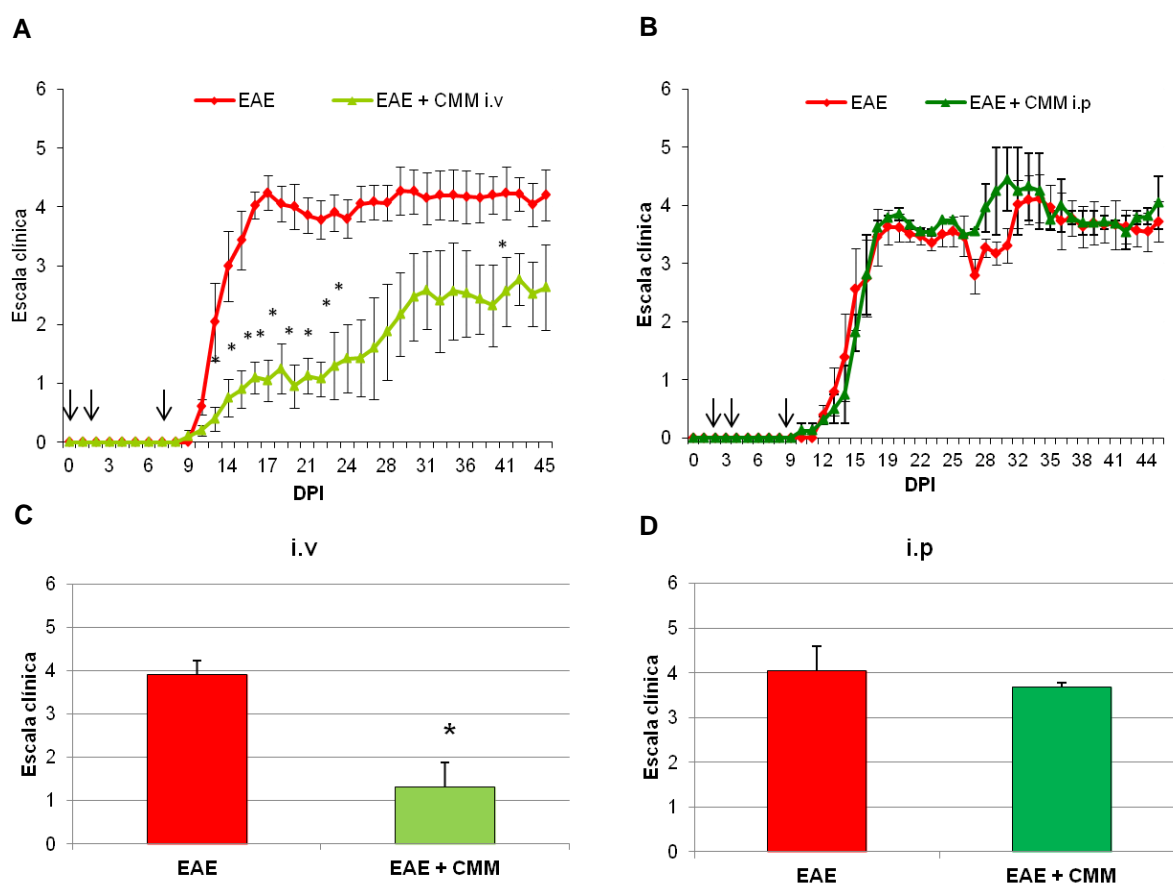


Figura 16. Efecto terapéutico de CMM inoculadas por vía i.v e i.p en EAE. La EAE se indujo por la inmunización con MOG₃₅₋₅₅ en ratones C57BL/6. Los ratones se trataron por vía i.v (**A**) o i.p (**B**), con 2×10^6 de CMM divididas en tres administraciones de 1×10^6 , 0.5×10^6 y 0.5×10^6 células en 200 μ l de volumen final en los días 0, 2 y 7, respectivamente, posteriores a la inmunización. Los signos clínicos se evaluaron como se describe en materiales y métodos. Las flechas negras indican la administración de CMM. Los valores representan la media del grado clínico de cada grupo \pm SEM, $n=5$ ratones por grupo. Media de la escala de discapacidad de cada grupo de ratones el día 20 DPI tras el tratamiento con CMM por vía i.v (**C**) e i.p (**D**). El análisis de los resultados se realiza usando Mann-Whitney U test. * $P < 0.05$ en comparación con ratones control de EAE.

Tras observar una reducción de los signos clínicos en los animales EAE, tras la administración de CMM en los días previos al inicio de los signos clínicos; pensamos que se podría obtener mayor efectividad aumentando el número de células y administrándolas durante días posteriores, cuando los signos clínicos vuelven a aumentar, quizá por la pérdida de eficacia terapéutica de las CMM. Buscando un mayor efecto terapéutico, se realizaron tratamientos por vía i.v con un total de 4×10^6 células en los días 0, 2, 7, 14, 16 y 21 DPI, repartidas en 6 infusiones de 1×10^6 , 0.5×10^6 , 0.5×10^6 , 1×10^6 , 0.5×10^6 y 0.5×10^6 CMM, respectivamente. Sin embargo, como se muestra en la **figura 17**, no se obtuvo ningún beneficio añadido respecto a la reducción de los signos clínicos.

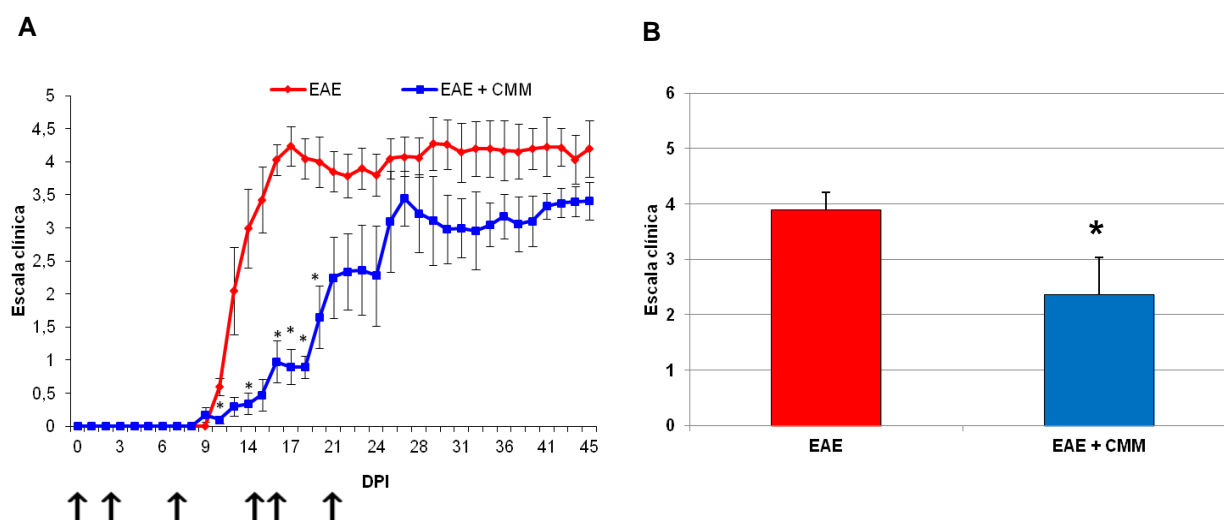


Figura 17. Efecto terapéutico de CMM en EAE. La EAE se indujo por la inmunización con MOG₃₅₋₅₅ en ratones C57BL/6. Los ratones se trataron por vía i.v con 4×10^6 de CMM divididas en seis administraciones de 1×10^6 , 0.5×10^6 , 0.5×10^6 , 1×10^6 , 0.5×10^6 y 0.5×10^6 de células en 200 μ l de volumen final en los días 0, 2, 7, 14, 16 y 21, respectivamente, posteriores a la inmunización (A). Los signos clínicos se evaluaron como se describe en materiales y métodos. Las flechas negras indican el inicio del tratamiento con CMM. Media de la escala de discapacidad de cada grupo de ratones en el día 20 DPI (B). Los valores representan la media del grado clínico de cada grupo \pm SEM, $n=5$ ratones por grupo. El análisis de los resultados se realiza usando Mann-Whitney U test. * $P<0.05$ en comparación con ratones control de EAE.

- **Evaluación de los ratones EAE tratados con CMM de pacientes y controles sanos**

Una vez seleccionado el tratamiento adecuado (vía, dosis y frecuencia) con CMM de controles sanos, se llevaron a cabo los experimentos comparativos con CMM de controles sanos y pacientes de EM.

- **Tratamientos**

Los ratones EAE se tratan con 2×10^6 CMM de controles sanos y pacientes de EM por vía i.v repartidas en dosis de 1×10^6 , 0.5×10^6 y 0.5×10^6 células en los días 0, 2 y 7, respectivamente, tras la inducción de EAE.

En la **figura 18** se muestra la evolución clínica de los ratones EAE tratados con CMM de controles sanos y pacientes de EM de manera individual que pertenecen a dos experimentos diferentes.

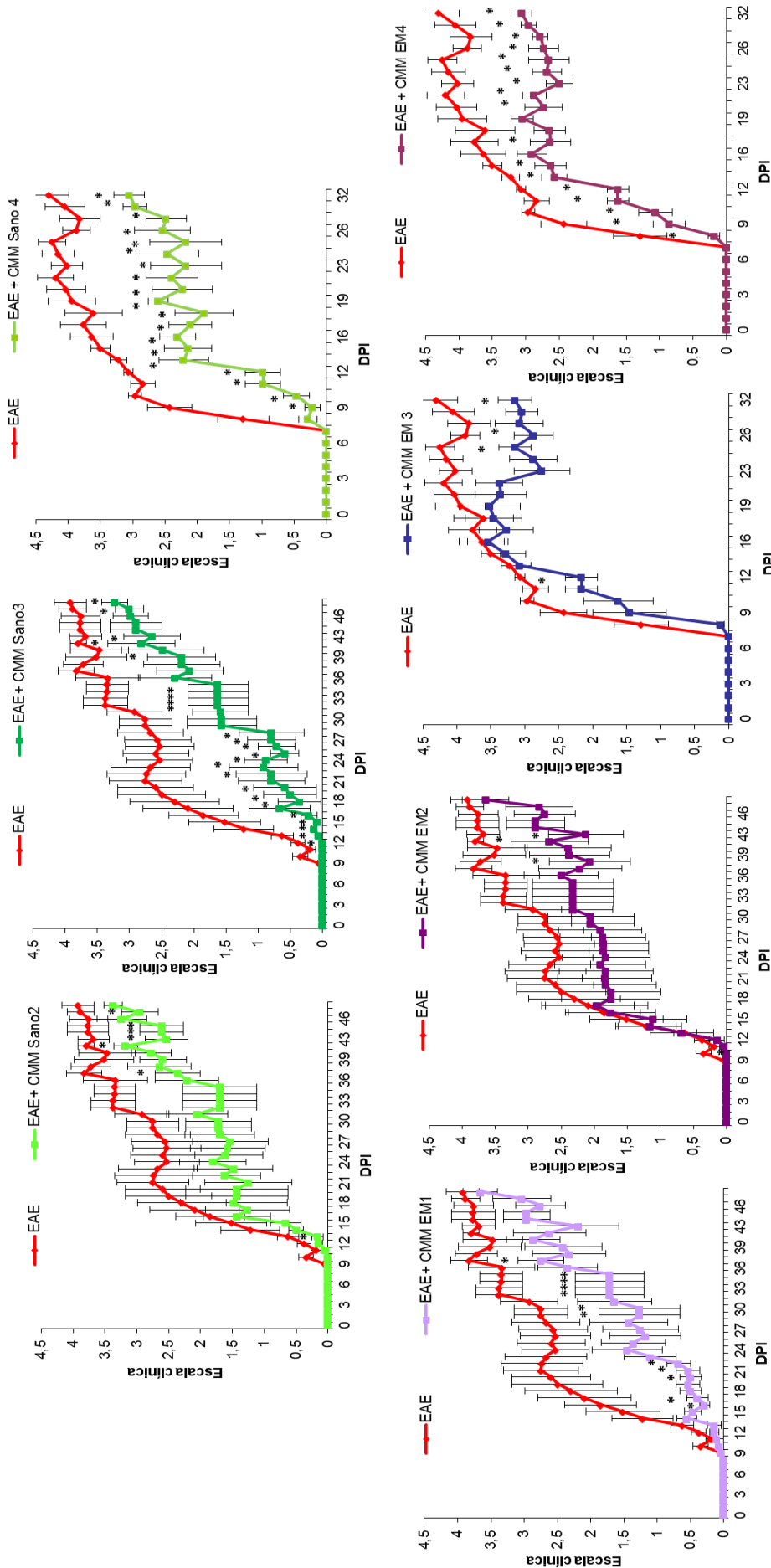


Figura 18. Efecto terapéutico de CMM en EAE. Curso clínico de ratones EAE ($n=7$) inoculados con MOG₃₅₋₅₅ (**rojo**) comparado con los ratones EAE tratados por vía i.v con 2×10^6 de CMM de los Controles Sanos N°2 (**A**), N°3 (**B**) y N° 4 (**C**) ($n=7$); y los pacientes de EM N°1 (**D**), N°2 (**E**), N° 3 (**F**) y N°4 (**G**) ($n=7$); divididos en tres administraciones de 1×10^6 , 0.5×10^6 y 0.5×10^6 en los días 0, 2 y 7 posteriores a la inoculación (DPI), respectivamente. Los signos clínicos se evaluaron como se describe en materiales y métodos. Las flechas negras indican la administración de CMM. Los valores representan la media del grado clínico de cada grupo \pm SEM. El análisis de los resultados se realiza usando Mann-Whitney U test. * $P < 0.05$ en comparación con ratones control de EAE.

En la **figura 19**, se pueden observar las medias de los tratamientos con CMM de controles sanos y pacientes de EM de los dos experimentos donde se muestra una reducción significativa de los signos clínicos.

Podemos concluir que existe una reducción significativa de los signos clínicos tras el tratamiento con CMM, que no correlaciona con la procedencia de las células (control sano o paciente). Además, se observa que los resultados presentan cierta heterogenidad, como consecuencia de la variabilidad existente entre las células de los diferentes individuos, con independencia del grupo de estudio al que pertenecen.

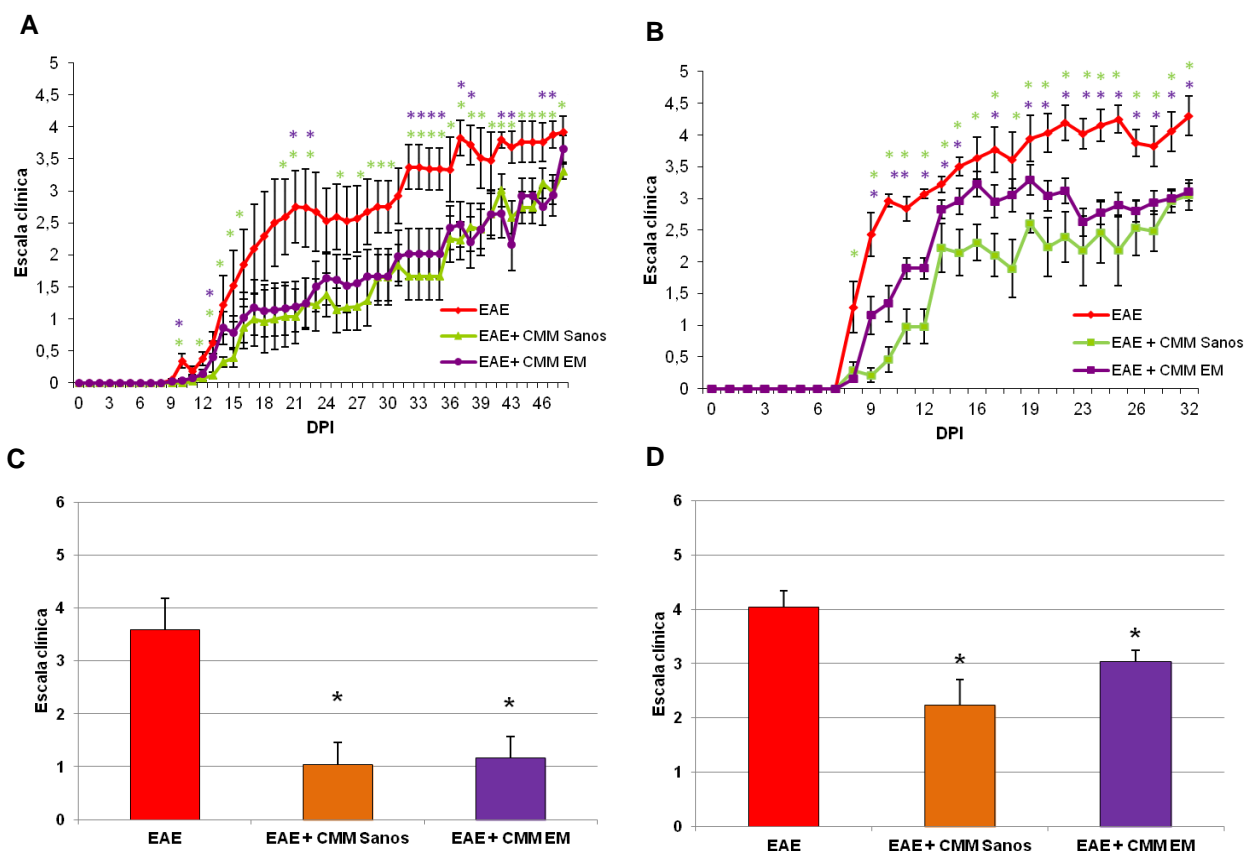


Figura 19. Efecto terapéutico de CMM en EAE. Curso clínico de ratones EAE (n=8) inoculados con MOG₃₅₋₅₅ (rojo) de dos experimentos diferentes (A y B) comparado con los ratones EAE tratados por vía i.v con 2×10^6 CMM de Controles Sanos (verde) n=7 y pacientes de EM (morado) n=7 durante 32 días posteriores a la inoculación (DPI). Los signos clínicos se evaluaron como se describe en materiales y métodos. Las flechas negras indican la administración de CMM. Media de la escala de discapacidad de cada uno de los grupos de ratones en el día 20 DPI del experimento A (C) y del experimento B (D). Los valores representan la media del grado clínico de cada grupo \pm SEM. El análisis de los resultados se realiza usando Mann-Whitney U test. *P<0.05 en comparación con ratones control de EAE (* CMM Sanos y * CMM EM).

▪ Histología

Tras lo expuesto anteriormente y observando que el tratamiento de los ratones EAE con CMM, procedentes de controles y pacientes, reduce los signos clínicos; se lleva a cabo el estudio

histológico de la inflamación, desmielinización y daño axonal en la zona lumbar de la médula de dichos animales.

La inflamación en la EAE se caracteriza por un aumento de la infiltración de células inmunitarias circulantes. Para la valoración del grado de infiltración, se realizaron tinciones con H&E en cortes histológicos de médula ósea a nivel de la zona lumbar. Como puede observarse en la **figura 20**, existe un aumento del número de infiltrados en la zona de las meninges de las médulas de los ratones EAE. En el caso, de los animales tratados con CMM hay una disminución significativa de la inflamación cuando comparamos con los ratones no tratados, sin embargo, no se detectan diferencias entre los tratamientos.

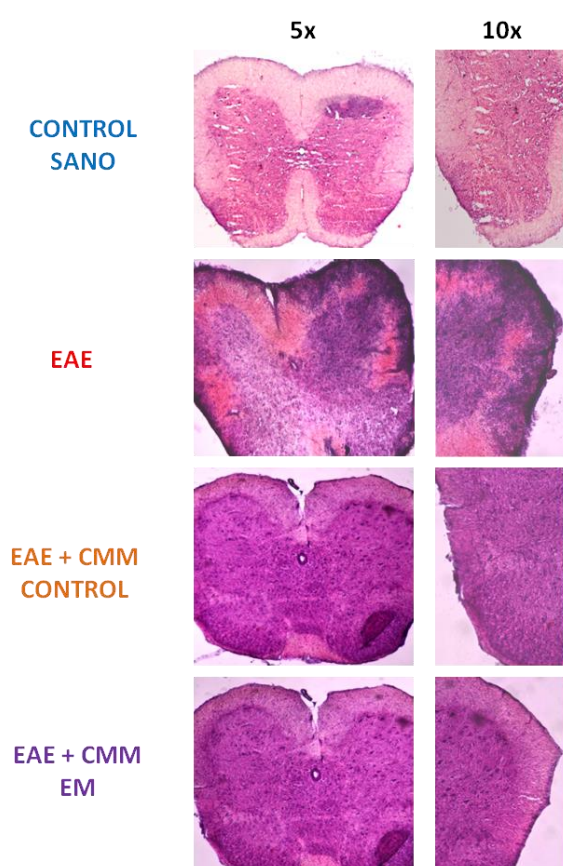


Figura 20. Inflamación en el tratamiento con CMM.

Imágenes por microscopía (5x y 10x), tras la tinción con hematoxilina y eosina, de las secciones lumbares de la médula ósea de un ratón sano y un ratón EAE, un ratón EAE tratado con CMM de un control sano y un ratón EAE tratado con CMM de un paciente de EM en día 32DPI.

Algunos de los infiltrados presentes en la médula de ratones EAE son linfocitos CD3 y macrófagos. Por ello, valoramos la presencia de estas poblaciones celulares en las médulas de nuestros animales de estudio por inmunofluorescencia mediante microscopía confocal.

Nuestros resultados muestran un aumento de los linfocitos CD3 (**figura 21**) y F4/80 (**figura 22**) en los ratones EAE. Sin embargo, cabe destacar que los ratones tratados con CMM (procedentes de donantes sanos y pacientes), presentan unos niveles de ambas poblaciones similares a los de los ratones sanos.

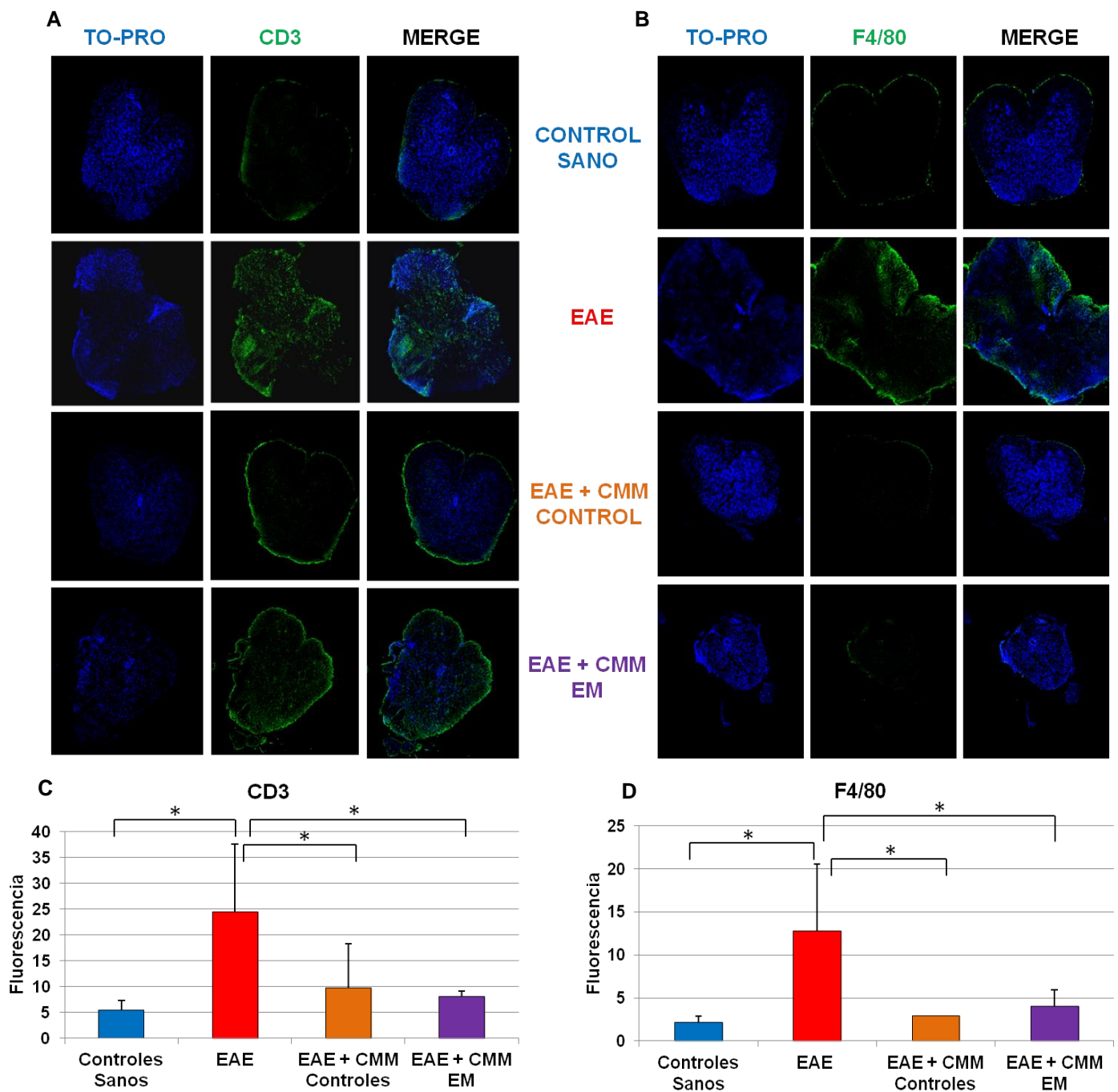


Figura 21. Linfocitos CD3 y F4/80 infiltrados en el tratamiento con CMM. Imágenes por microscopía confocal (10x) de las secciones lumbares de la médula ósea, a día 32 DPI, de un ratón sano, un ratón EAE, un ratón EAE tratado con 2×10^6 de CMM de un control sano y un ratón EAE tratado con 2×10^6 de CMM de un paciente de EM por vía i.v a los 0, 2 y 7 días posteriores a la inmunización. El panel muestra linfocitos infiltrados, mediante **TO-PRO** (núcleos), **CD3** (linfocitos) y **MERGE** que es la colocación de los 3 anteriores. **(B)** Se muestran imágenes de macrófagos infiltrados mediante el marcaje de **TO-PRO**, **F4/80** que marca macrófagos y **MERGE**. **(C-D)** Análisis cuantitativo de fluorescencia mediante microscopía confocal del marcaje de CD3 **(C)** y F4/80 **(D)** en un ratón sano (**azul**), un ratón EAE (**rojo**), un ratón tratado con CMM de un control sano (**naranja**) y un ratón tratado con CMM de un paciente de EM (**morado**).

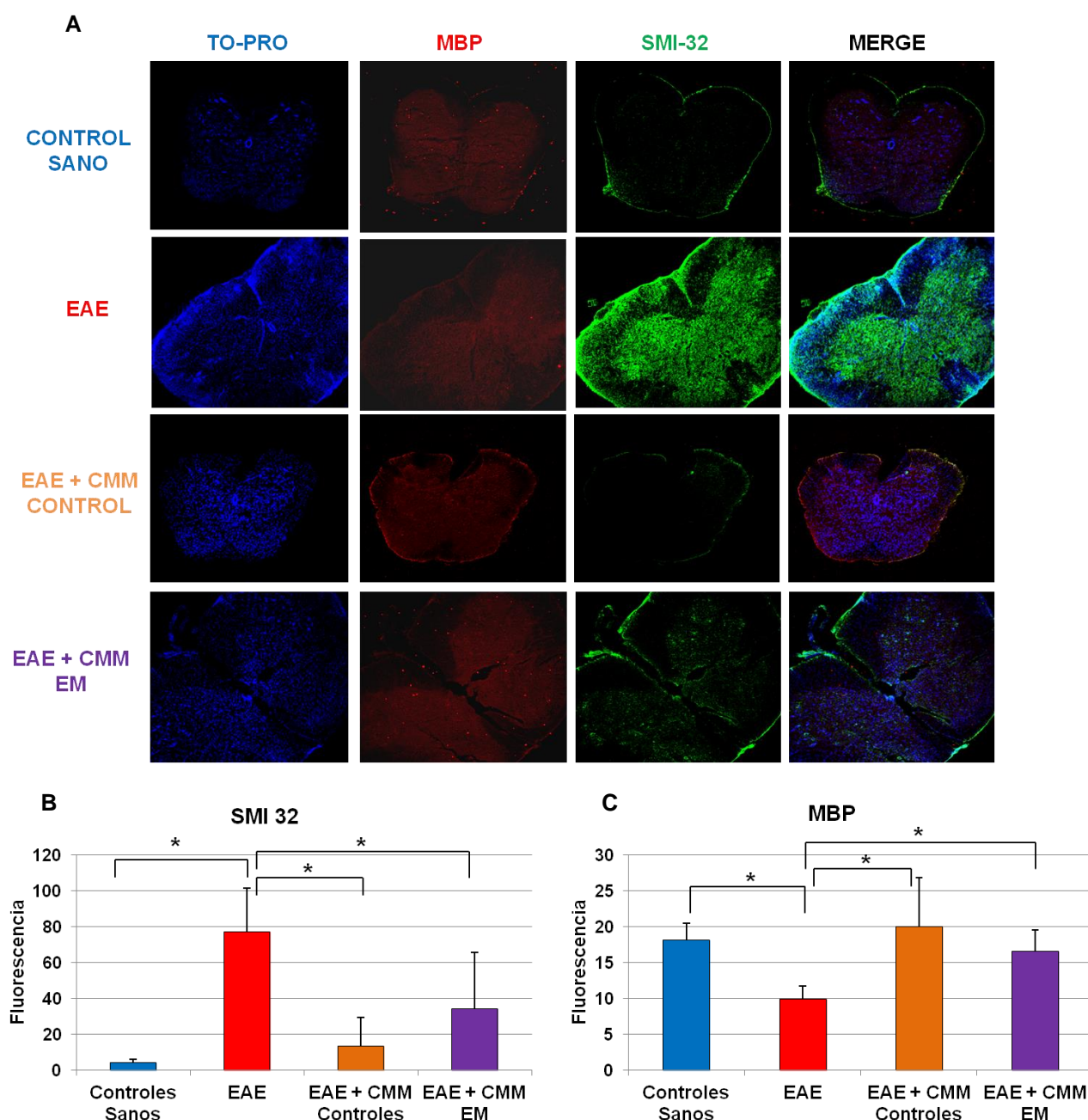


Figura 22. Inflamación, desmielinización y daño axonal en el tratamiento con CMM. (A) Imágenes por microscopía confocal (10x) de las secciones lumbares de la médula ósea, a día 32 DPI, de un ratón sano, un ratón EAE, un ratón EAE tratado con 2×10^6 de CMM de un control sano y un ratón EAE tratado con 2×10^6 de CMM de un paciente de EM por vía i.v a los 0, 2 y 7 días posteriores a la inmunización. Los paneles muestran infiltrados mediante **TO-PRO** (núcleos), desmielinización con **MBP** y daño axonal con **SMI-32** que marca neurofilamentos no fosforilados. (B-C) Análisis cuantitativo de fluorescencia mediante microscopía confocal de los marcajes de MBP (B) y SMI 32 (C) en un ratón sano (**azul**), un ratón EAE (**rojo**), un ratón tratado con CMM de un control sano (**naranja**) y un ratón tratado con CMM de un paciente de EM (**morado**).

Otros aspectos importantes en la EAE, son la desmielinización y el daño axonal. Para evaluar estos aspectos, se realizaron cortes histológicos en criostato a nivel de la zona lumbar para realizar

marcajes con TO-PRO para marcar núcleos, con Proteína Básica de Mielina (MBP) para valorar desmielinización y con SMI-32 (neurofilamentos no fosforilados) para valorar el daño axonal (**figura 22**).

Se observó un aumento de la señal SMI-32, indicando daño axonal, y una disminución de la señal de MBP, debido al proceso de desmielinización, en la médula de los ratones EAE. Sin embargo, no se mostraron diferencias en los animales tratados con CMM de controles o paciente de EM, encontrando niveles similares de daño axonal y desmielinización a los encontrados en los ratones sanos.

Por otro lado, debido a la importancia del sistema cannabinoide en la EM, ya mencionada en la introducción, se analiza la expresión de CB₁ y CB₂ en la médula de los ratones por inmunofluorescencia.

Tras la cuantificación de ambos receptores, observamos que la expresión de CB₁ disminuye en el grupo de los ratones EAE, pero se mantiene a nivel de los controles sanos en los ratones tratados con CMM; sin embargo, la expresión de CB₂ siguen un patrón inverso, aumenta su expresión en el grupo EAE y permanece en niveles más bajos en los ratones tratados de manera similar a los controles sanos. En ambos casos no se observan diferencias en la expresión de ambos receptores entre los ratones tratados con CMM de controles sanos y pacientes de EM (**Figura 23**).

RESULTADOS

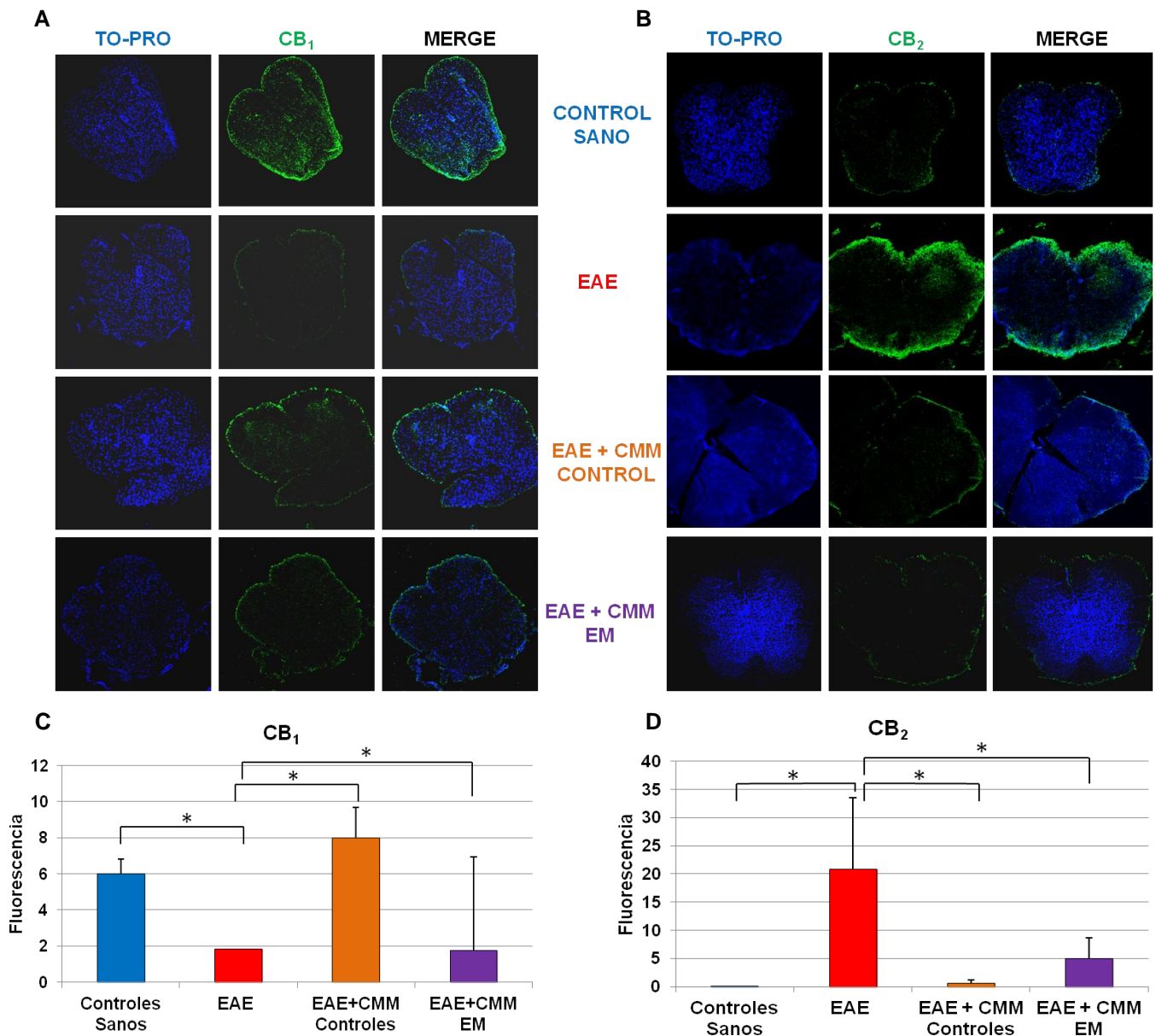


Figura 23. CB₁ y CB₂ en el tratamiento con CMM. Imágenes por microscopía confocal (10x) de las secciones lumbares de la médula ósea, a día 32 DPI, de un ratón EAE, un ratón EAE tratado con CMM de un Control Sano y un ratón EAE tratado con CMM de un paciente de EM. El panel **A** muestra infiltrados mediante **TO-PRO** (núcleos), **CB₁** (receptor de cannabinoides Tipo 1) y **MERGE** que es la colocalización de los 2 anteriores; y el panel **B** el marcaje de **TO-PRO**, **CB₂** (receptor de cannabinoides Tipo 2) y **MERGE**. (**C-D**) Análisis de fluorescencia mediante microscopía confocal del marcaje de CB₁ (**C**) y CB₂ (**D**) en un ratón sano (**azul**), un ratón EAE (**rojo**), un ratón tratado con CMM de un control sano (**naranja**) y un ratón tratado con CMM de un paciente de EM (**morado**).

5.5 CARACTERIZACIÓN DE LOS RECEPTORES CB₁ Y CB₂ EN LAS CMM Y DE SU RESPUESTA FRENTE A CANNABINOIDES ENDÓGENOS Y EXÓGENOS

• Caracterización de los receptores CB₁ y CB₂ en CMM de controles y pacientes

Uno de los objetivos de este trabajo es analizar si la expresión de los receptores de cannabinoides en las CMM, está condicionada por su procedencia (control o paciente de EM), ya que otros autores, han detectado mayor expresión de CB₁ y CB₂ en células procedentes de pacientes de EM. Para ello, caracterizamos los receptores de cannabinoides (CB₁ y CB₂) mediante el análisis de proteína por microscopía confocal y citometría de flujo; y el análisis de ARNm por PCR en tiempo real.

▪ Expresión ARNm

Para caracterizar el sistema endocannabinoide en las CMM, analizamos la expresión génica de los receptores de cannabinoides (CB₁ y CB₂) y del enzima FAAH, ya que son algunos de los principales componentes del SEC.

La expresión de CB₁, CB₂ y FAAH en CMM de controles sanos y pacientes de EM, se detecta mediante PCR en tiempo real. Como se muestra en la **figura 24**, en los tres casos, se trata de niveles muy bajos de expresión. Sin embargo, no existen diferencias en la expresión de CB₁ (**A**), CB₂ (**B**) y FAAH (**C**) entre las CMM de controles sanos y pacientes de EM.

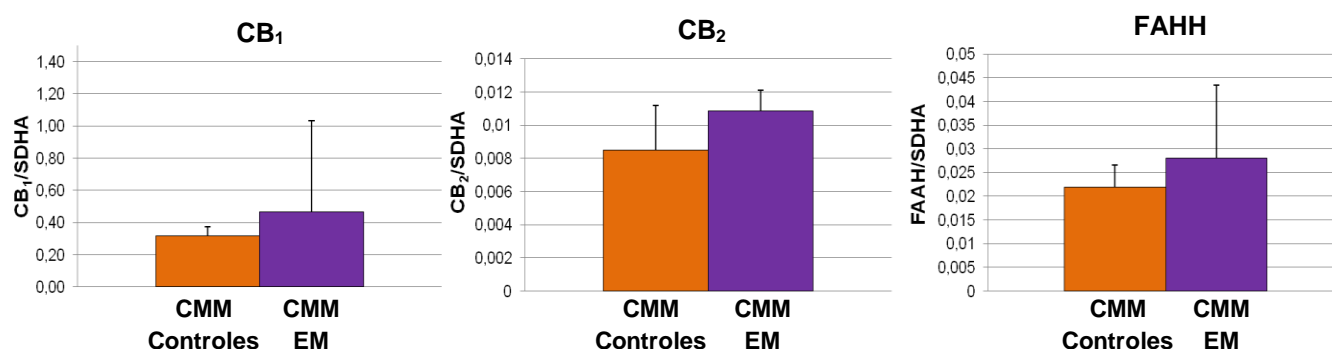


Figura 24. Expresión de los receptores CB₁ y CB₂ en CMM. Detección por PCR en tiempo real de los niveles de expresión relativos de CB₁ (**A**) y CB₂ (**B**) y FAAH (**C**) en CMM de controles sanos (n=4) (naranja) y pacientes de EM (n=6) (morado). Los cálculos de obtienen relativizando a SDHA. Los datos representan la media de n=3 experimentos independientes ± Desvest.

Podemos concluir que, las CMM expresan CB₁, CB₂ y FAAH en niveles muy bajos. Además, al comparar las CMM de controles y pacientes de EM no se detectan diferencias en la expresión de dichos elementos.

▪ Expresión proteica

Para estudiar la expresión de CB₁ y CB₂ en CMM de controles y pacientes de EM a nivel de proteína, usamos las técnicas de citometría de flujo y microscopía confocal.

En la **figura 25** observamos la expresión de CB₁ y CB₂ en las CMM de un control sano (**A-B**) y un paciente de EM (**C-D**) en superficie, y a nivel intracelular, por citometría de flujo. Son imágenes representativas de las CMM de un donante sano y un paciente de EM, pero se detectan diferencias en la localización de la proteína; encontrando mayores niveles intracelulares de ambos receptores.

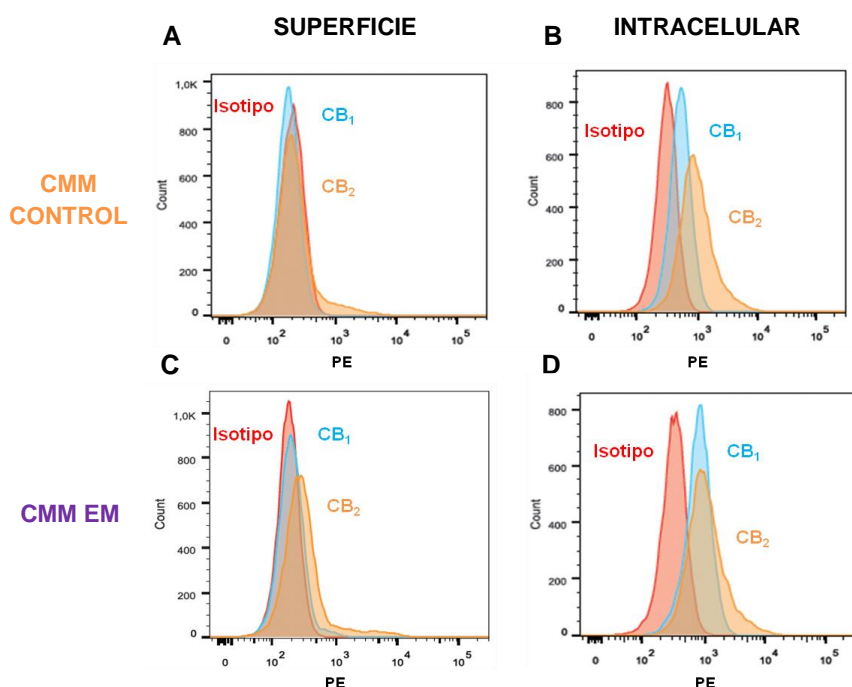


Figura 25. Expresión de los receptores CB₁ y CB₂ en CMM. (A) Histogramas de citometría de flujo de la expresión de CB₁ (azul) y CB₂ (naranja) en superficie (A-B) e intracelular (C-D) en CMM de un control sano y un paciente de EM respectivamente. Como isotipo se utilizan las células marcadas con PE.

Cuando analizamos la expresión de ambos receptores en las muestras de controles y pacientes (**figura 26**), detectamos que la expresión de CB₁ (A) y CB₂ (B) en superficie es significativamente mayor en CMM de pacientes. Sin embargo, dichas diferencias no existen cuando comparamos la expresión de CB₁ (C) y CB₂ (D) a nivel intracelular, encontrando niveles de proteína idénticos en las CMM de pacientes y controles. Además, podemos comprobar que CB₁ y CB₂ se encuentran localizados de manera mayoritaria a nivel intracelular (**figuras 25 y 26**).

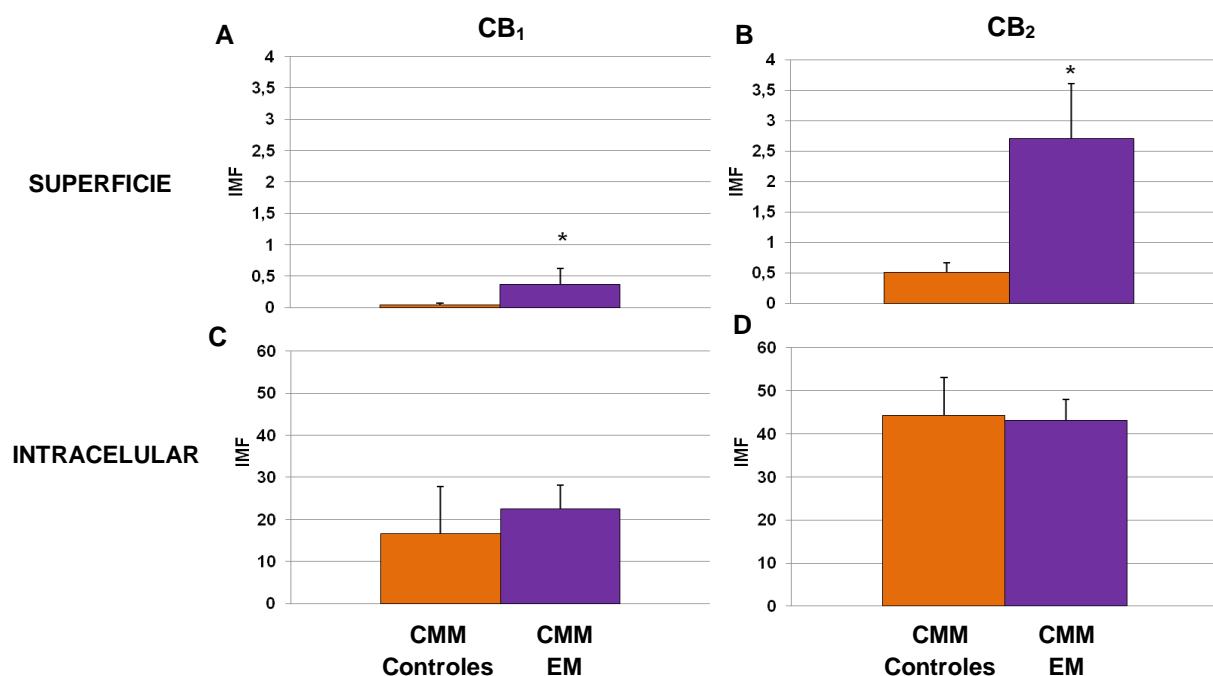


Figura 26. Expresión de los receptores CB₁ y CB₂ en CMM. Análisis por citometría de flujo de CB₁ y CB₂ en CMMMO de controles sanos (n=4) (naranja) y pacientes de EM (n=5) (morado) comparando los niveles de proteína en superficie (A-B) e intracelular (C-D). Los datos representan la media de n=3 experimentos independientes ± Desvest.

Cuando analizamos la expresión de los receptores por microscopía confocal (**figura 27**), observamos que las CMM de controles sanos y pacientes de EM expresan CB₁ (A) y CB₂ (B) a nivel intracelular. En la figura, como control negativo de CB₂ se muestran las células del estriado de rata (M213-20), y como control positivo de expresión, las células HT29, hepatocitos transfectados con una construcción que sobre expresa CB₂. Para CB₁, como control negativo de expresión se muestran de nuevo las células M213-20 que tampoco expresan CB₁ y como control positivo, se presentan las células PC12, células de médula adrenal de rata.

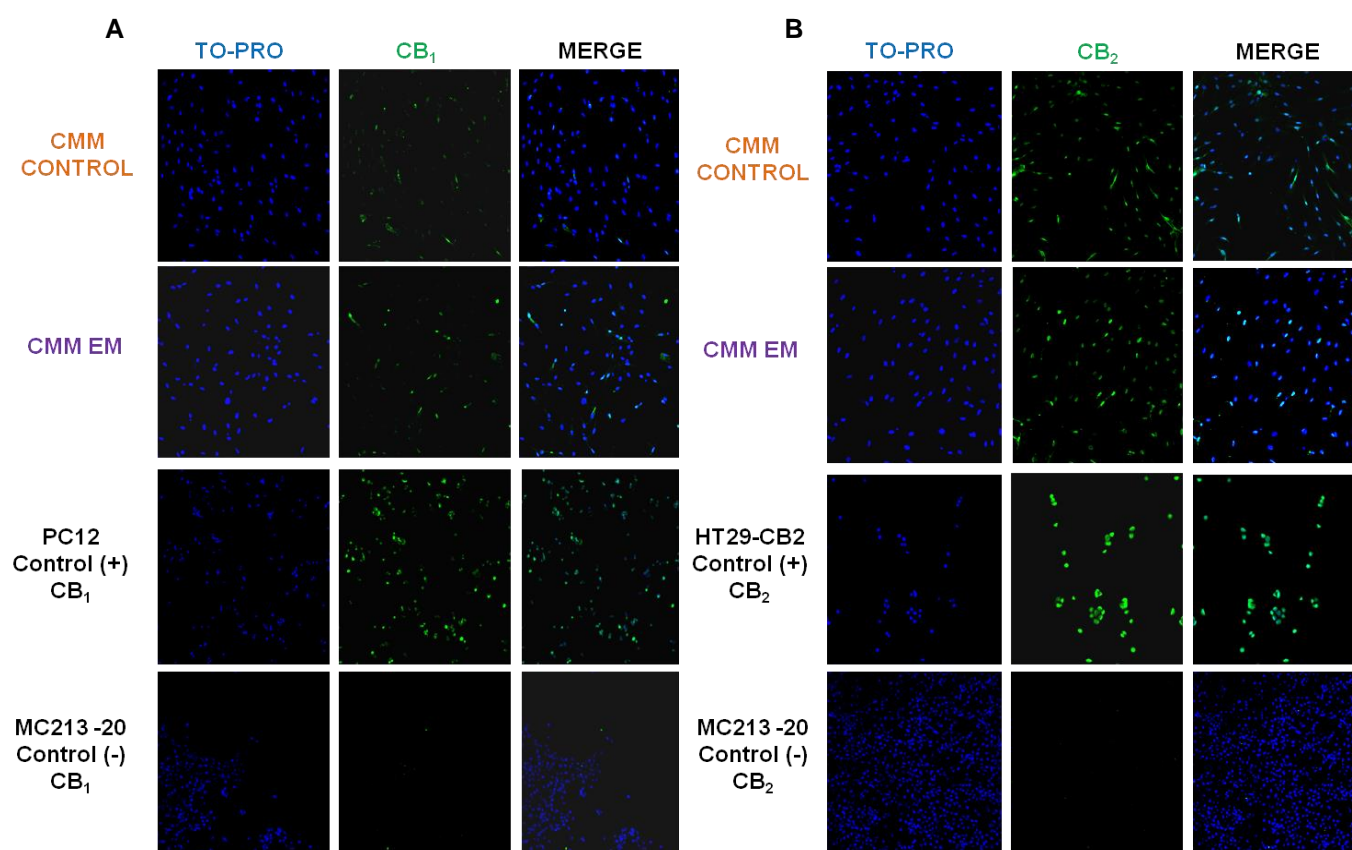


Figura 27. Expresión de los receptores CB₁ y CB₂ en CMM tras permeabilizar. Determinación por microscopía confocal de CB₁ y CB₂ intracelular. Imágenes representativas de CMM de un control y un paciente de EM, con sus respectivos controles de expresión. Como control negativo de CB₂ se muestran las células M213-20, y como control positivo, las células HT29-CB₂ (A). Para CB₁, como control negativo se muestran las células M213-20 y como control positivo, las células PC12 (B). Los marcadores usados son: núcleos (ToPro), el receptor de cannabinoides 2 (CB₂) el receptor de cannabinoides 1 (CB₁) y la colocalización de los anteriores (Merge).

En la **figura 28** se representa la cuantificación de la fluorescencia para CB₁ y CB₂ en las CMM por microscopía de fluorescencia. Como puede observarse no existen diferencias en la expresión de ambos receptores, comparando las CMM de controles y pacientes. Tampoco, se detectan diferencias en la expresión de uno u otro receptor. Estos resultados, coinciden con la expresión de CB₁ y CB₂ por citometría de flujo a nivel intracelular.

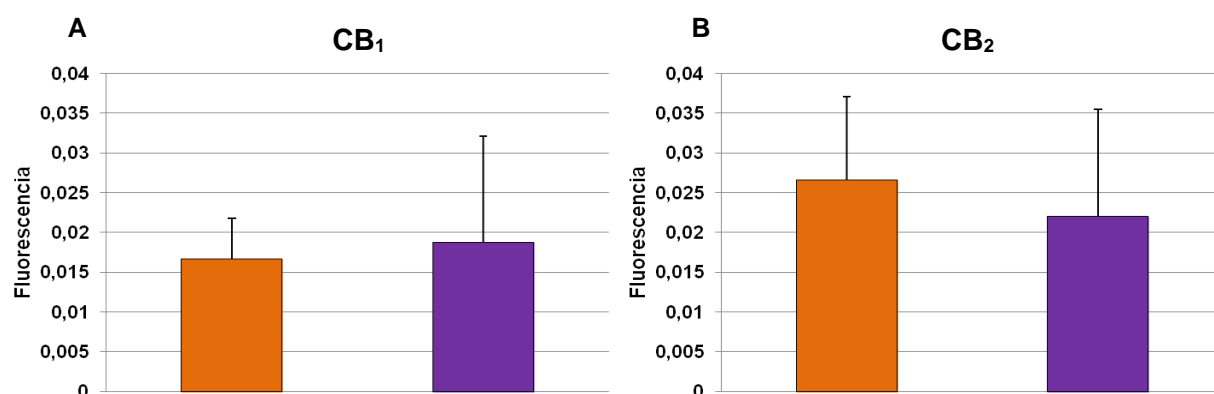


Figura 28. Expresión de los receptores CB₁ y CB₂ en CMM. Medias de la IMF de CB₁ (A) y CB₂ (B) en CMM de controles sanos (n=1) (naranja) y pacientes de EM (n=2) (morado) mediante microscopía confocal. Los datos representan la media de n=4 muestras \pm Desvest.

Los resultados muestran una expresión similar, a nivel de ARN, de CB₁ y CB₂ similar en CMM de controles sanos y pacientes de EM. Los datos tomados a nivel de proteína, indican una mayor expresión de CB₂ y CB₁ en CMM procedentes de EM en superficie. Sin embargo, cuando analizamos la expresión intracelular de los receptores, observamos que no existen diferencias entre CMM de controles y pacientes.

- **Respuesta de las CMM frente a cannabinoides endógenos y exógenos**
 - **Elección de los compuestos cannabinoides y concentraciones de toxicidad**

Tras demostrar que las CMM de controles y pacientes de EM expresan CB₁ y CB₂, uno de los objetivos de este trabajo es estudiar el efecto que los cannabinoides tienen sobre las distintas características y propiedades de estas células.

Se realiza un análisis previo de dosis-respuesta, de cada uno de los cannabinoides seleccionados, para establecer las concentraciones que se utilizarán en los estudios posteriores. Elegimos dos cannabinoides exógenos, ya descritos en la literatura por sus propiedades antiinflamatorias y de mejoría de la evolución clínica en la EAE, cuya vía de acción se desarrolla a través de los dos receptores CB₁ y CB₂ (WIN), o de forma independiente a los mismos (CBD). Como cannabinoide endógeno elegimos la AEA; ya que se trata de un ligando endógeno para CB₁ y CB₂ con efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios.

Evaluamos el efecto de los compuestos elegidos sobre la viabilidad de las CMM por la técnica colorimétrica de MTT. Para ello, realizamos una curva de toxicidad de las CMM tras el tratamiento con WIN, CBD y AEA a concentraciones de 0,1; 1; 5; 10 y 20 μ M durante 48 y 72 horas, 7 y 15 días en cultivo.

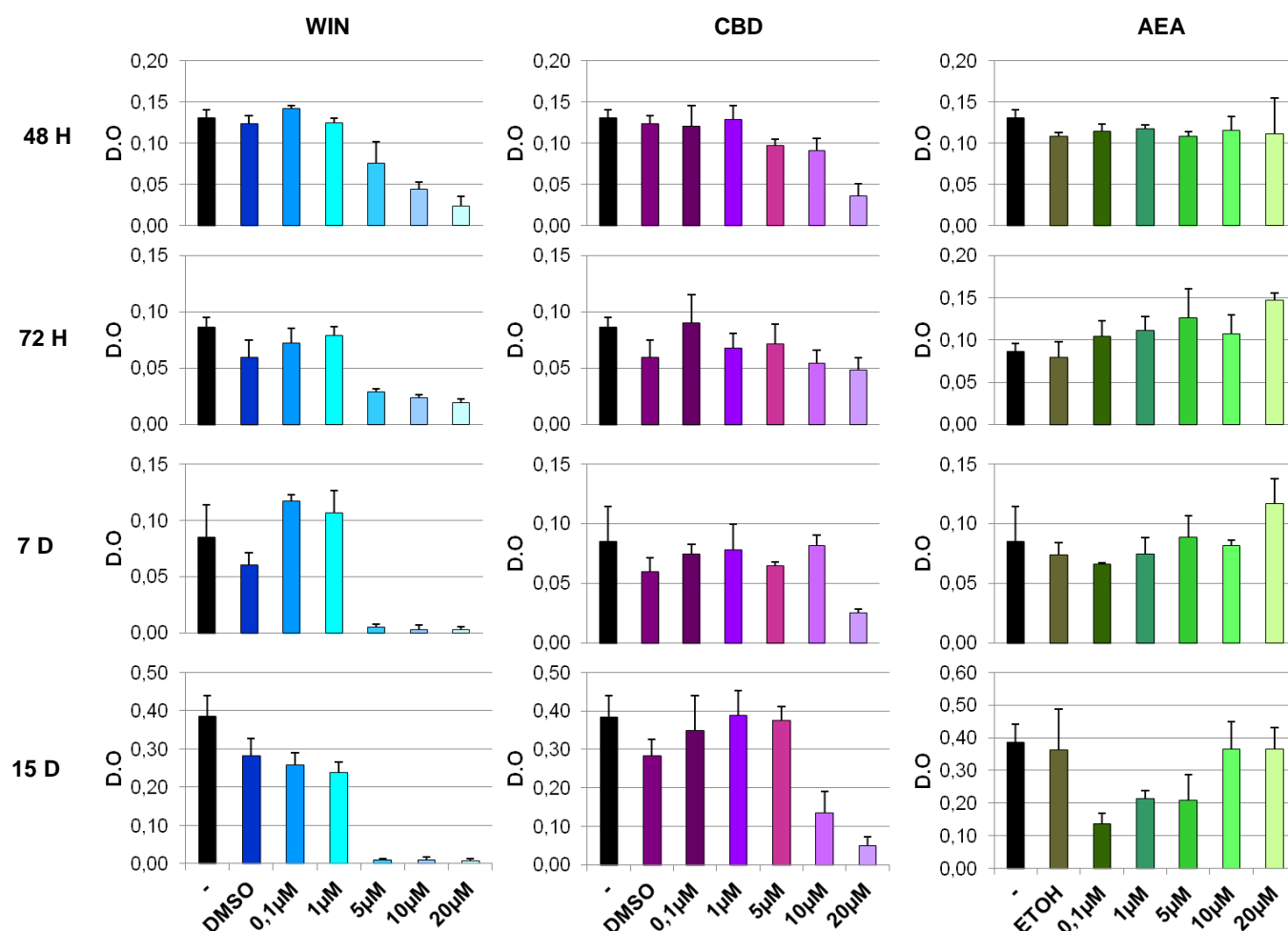


Figura 29. Curva de toxicidad de los compuestos cannabinoides en las CMM. Se mide la proliferación de las CMM en presencia de los compuestos cannabinoides WIN (azules), CBD (morados) y AEA (verdes) a concentraciones crecientes (0,1; 1; 5; 10 y 20µM) mediante la técnica colorimétrica de MTT. Las CMM fueron incubadas (5.000 células/cm²) con las concentraciones indicadas durante 48h, 72h, 7 y 15 días. Como control se utilizó el vehículo (DMSO o ETOH) con el que son resuspendidos los cannabinoides a la máxima concentración. Los datos representan la media (n=3) ± Desvest.

Como podemos comprobar en la **figura 29** el tratamiento con WIN no afecta a la viabilidad de las CMM en cultivo durante 15 días hasta una concentración de 1µM. A partir de una concentración de 5µM observamos una disminución de la viabilidad del cultivo desde las 72 horas. En cuanto al tratamiento con CBD, las CMM no ven modificada su viabilidad hasta una concentración de 5µM durante los 15 días en cultivo, sin embargo, a partir de 10µM el cultivo disminuye significativamente su viabilidad. Por otro lado, el tratamiento con AEA, no parece afectar a la viabilidad de las CMM, ya que a partir de la concentración de 5µM las células disminuyen su viabilidad tras 7 días en cultivo, efecto que parece desaparecer a los 15 días.

Teniendo en cuenta todos los resultados, los tratamientos elegidos para todo el estudio serán WIN 1 μ M, CBD 5 μ M y AEA 5 μ M, ya que son concentraciones no tóxicas para las CMM.

- Evaluar la capacidad de formación de colonias de las CMM

Analizamos si la capacidad de formar UFC de las CMM de controles y pacientes de EM se ve afectada tras el tratamiento con cannabinoides endógenos y exógenos.

Las CMM de controles y pacientes, se tratan con los cannabinoides exógenos WIN y CBD a una concentración de 1 y 5 μ M respectivamente; y con el cannabinoide endógeno AEA a una concentración de 5 μ M durante 15 días.

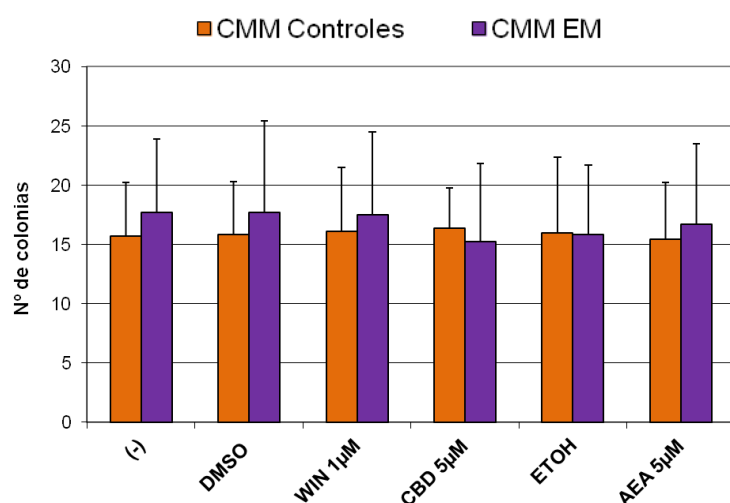


Figura 30. UFC de las CMM tras el tratamiento con cannabinoides.

Comparativa entre las medias del número de colonias formadas por las CMM de controles (naranja) y pacientes de EM (morado) en medio estándar (-), con los Vehículos (DMSO y ETOH) y con los distintos compuestos WIN (1 μ M), CBD (5 μ M) y AEA (5 μ M) tras 15 días en cultivo. Los datos representan la media de n=6 experimentos independientes \pm Desvest.

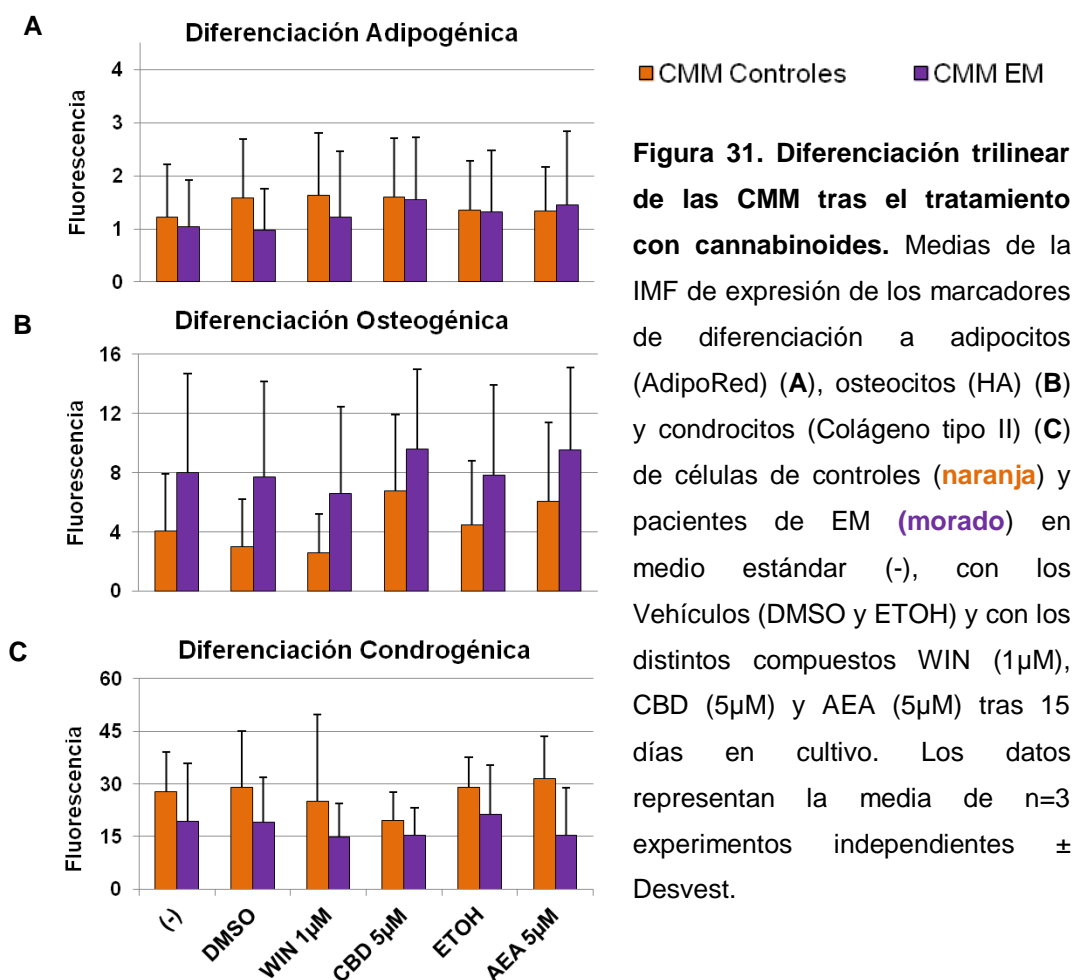
Como podemos comprobar en la **figura 30** el tratamiento con los compuestos cannabinoides no afecta a la capacidad de formar colonias de las CMM de controles y pacientes de EM.

- Evaluar la transformación trilinear de las CMM

El tratamiento de las CMM con cannabinoides tanto endógenos como exógenos puede estar afectando a los procesos de adipogénesis, osteogénesis y condrogénesis; así como modificando la expresión de los receptores de cannabinoides CB₁ y CB₂ en las CMM diferenciadas de controles y pacientes de EM.

En este caso las CMM de controles y pacientes se someten a los procesos de adipogénesis, osteogénesis y condrogénesis; y además, son tratadas con los cannabinoides exógenos WIN y CBD a una concentración de 1 y 5 μ M respectivamente; y con el cannabinoide endógeno AEA a una concentración de 5 μ M.

Las diferenciaciones de las CMM hacia células de linaje adipogénico, osteogénico y condrogénico se comprobaron mediante los marcajes con aceite rojo O, HA y con el anticuerpo de Colágeno tipo II respectivamente.



No existen cambios en el proceso adipogénico de las CMM de controles y pacientes de EM tras el tratamiento con cannabinoides (figura 31 A). Sin embargo, como se puede comprobar en la figura 31 B, tanto las CMM de pacientes como de controles tratadas con CBD y AEA muestran una tendencia a aumentar su proceso de diferenciación osteogénica sin ser significativa.

En cuanto al proceso de condrogénesis no se observa ningún tipo de cambio en la formación de matriz y por tanto en la producción de colágeno tipo II en las CMM de controles y pacientes tras el tratamiento con los compuestos cannabinoides (figura 31 C).

▪ Evaluar la capacidad antiproliferativa

Para estudiar si la capacidad inmunomoduladora de las CMM se ve alterada tras el tratamiento con cannabinoides endógenos y exógenos, las CMM de controles y pacientes de EM se cultivan en presencia de PBMC aisladas de sangre periférica de donantes sanos estimuladas, o con células encefalitógenas de ratón, estimuladas durante 3 días. En ambos casos, los cocultivos son tratados con los distintos compuestos cannabinoides.

Antes de comenzar el ensayo se realiza una curva de toxicidad de distintas concentraciones (0,1; 1; 5; 10 y 20 μ M) de los compuestos cannabinoides WIN, CBD y AEA sobre las PBMC durante 72 horas en cultivo.

Se puede comprobar en la **figura 32** que las concentraciones de WIN y CBD superiores a 1 μ M y 5 μ M respectivamente, son tóxicas para las PBMC a partir de las 72 horas en cultivo. Por el contrario, ninguna de las concentraciones testadas para AEA resultaron tóxicas para las mismas.

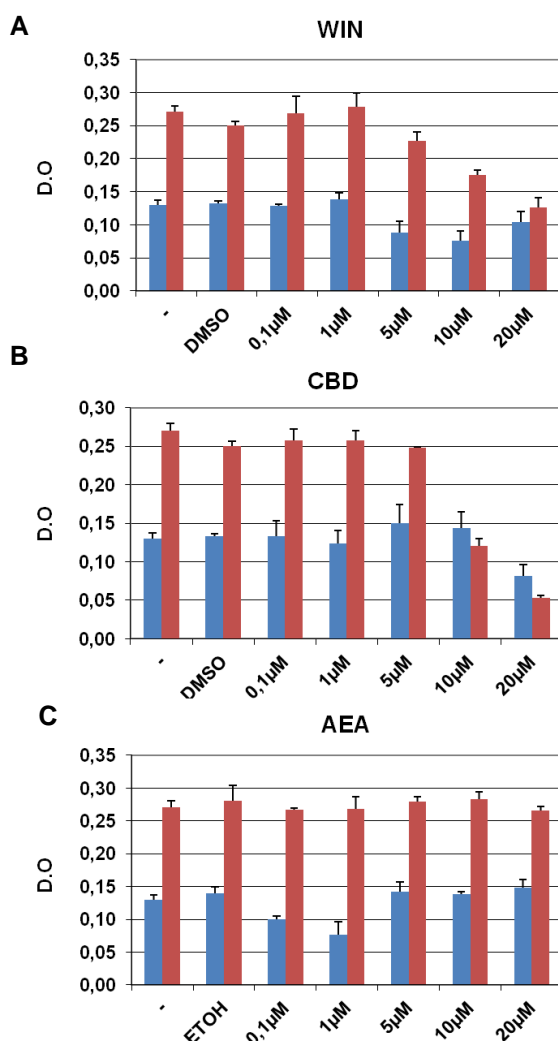


Figura 32. Curva de toxicidad de los compuestos cannabinoides en las PBMC.

Se mide la proliferación de las PBMC sin estimular (-) (azul) y estimuladas con 20 μ g/ml PHA (rojo) en presencia de los compuestos cannabinoides WIN, CBD y AEA a concentraciones crecientes (0,1; 1; 5; 10 y 20 μ M) mediante la técnica colorimétrica de MTT. Las PBMC fueron incubadas (250.000 células/pocillo) con las concentraciones indicadas durante 72h. Se utilizan los vehículos (DMSO o ETOH) disueltos a la máxima concentración. Los datos representan la media (n=3) \pm Desvest.

Podemos concluir que los tratamientos con compuestos cannabinoides seleccionados para los estudios con CMM (WIN 1 μ M, CBD 5 μ M y AEA 5 μ M) no son tóxicos para las PBMC en cultivo durante 72 horas. Por ello, estos mismos tratamientos serán utilizados para los estudios realizados en cocultivo (CMM:PBMC).

○ Efecto de las CMM sobre la proliferación de las PBMC

Para analizar el efecto de los compuestos cannabinoides sobre el potencial antiproliferativo de las CMM sobre las PBMC, el cocultivo celular (CMM:PBMC) es tratado con WIN, CBD y AEA a unas concentraciones de 1, 5 y 5 μ M respectivamente, durante 3 días. La cuantificación de la proliferación se lleva a cabo mediante colorimetría con MTT.

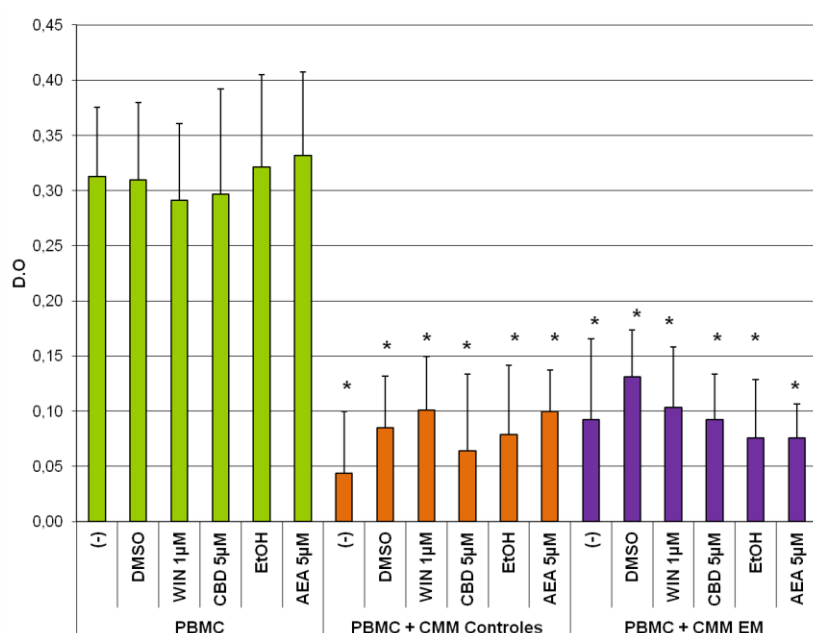


Figura 33. Proliferación de PBMC estimuladas en cocultivo con CMM de controles y pacientes de EM tras el tratamiento con cannabinoides. Se determina por ensayo colorimétrico de MTT la proliferación de PBMC de donantes sanos estimuladas con PHA (20 μ g/ml) en presencia de CMM de controles sanos (n=4) (naranja) y pacientes de EM (n=6) (morado) durante 72 horas a un ratio 1:20 (CMM:PBMC) en condiciones de cultivo estándar (-), con los vehículos (DMSO y EtOH) y con los distintos compuestos WIN (1 μ M), CBD (5 μ M) y AEA (5 μ M) tras 15 días en cultivo. Los datos representan la media de n=3 experimentos independientes \pm Desvest.

En la **figura 33** se muestra que las CMM de controles sanos y pacientes de EM disminuyen la proliferación de las PBMC de manera significativa. Sin embargo, esta capacidad para disminuir la proliferación de las PBMC no se encuentra modificada por ningún tratamiento con los compuestos cannabinoides.

○ Efecto de las CMM sobre la proliferación de las células encefalíticas

Evaluamos el efecto antiproliferativo de las CMM sobre las células encefalíticas murinas tras el tratamiento del cocultivo (CMM:encefalíticas) con los compuestos cannabinoides WIN (1µM), CBD (5µM) y AEA (5µM) durante 72 horas.

El tratamiento con los distintos compuestos cannabinoides (**figura 34**) no altera la disminución de la proliferación de las células encefalíticas que produce la presencia de CMM de controles y pacientes de EM.

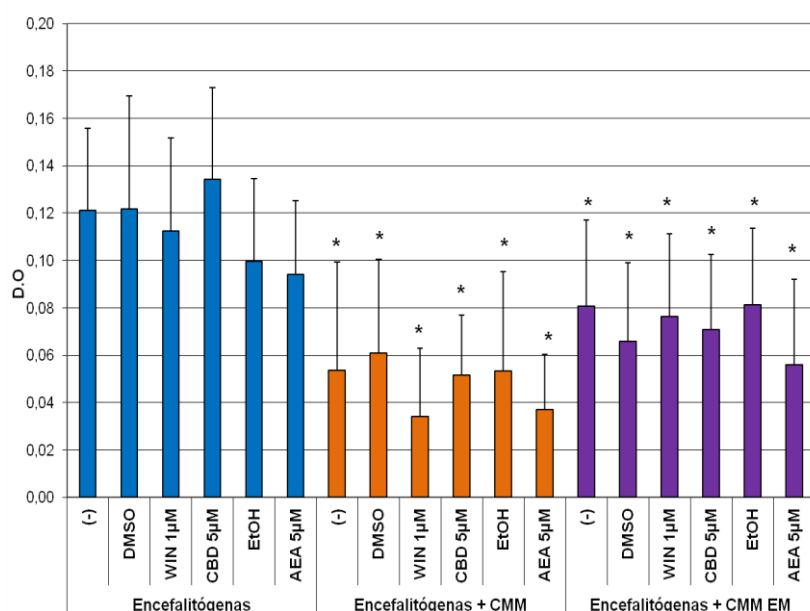


Figura 34. Proliferación de células encefalíticas de ratón en cocultivo con CMM de controles y pacientes de EM tras el tratamiento con cannabinoides. Se determina por ensayo colorimétrico de MTT la proliferación de células encefalíticas de ratones EAE (inmunizados con el péptido MOG₃₅₋₅₅) estimuladas con MOG (25µg/ml) en presencia de CMM de controles sanos (n=2) (naranja) y pacientes de EM (n=2) (morado) durante 72 horas a un ratio 1:20 (CMM:encefalíticas) en condiciones de cultivo estándar (-), con los Vehículos (DMSO y ETOH) y con los distintos compuestos WIN (1µM), CBD (5µM) y AEA (5µM) tras 15 días en cultivo. Los datos representan la media de n=2 experimentos independientes ± Desvest.

▪ Evaluar la capacidad inmunomoduladora de las CMM sobre la proliferación de las PBMC

Tras mostrar anteriormente, que la capacidad antiproliferativa de las CMM de controles y pacientes sobre las PBMC no se ve modificada tras el tratamiento con compuestos cannabinoides; analizamos los posibles efectos en la producción de las citoquinas IL-4, IL-6, IFN-γ e IL-10 tras 72 horas en cocultivo mediante la técnica ELISA, tras el tratamiento con CBD.

RESULTADOS

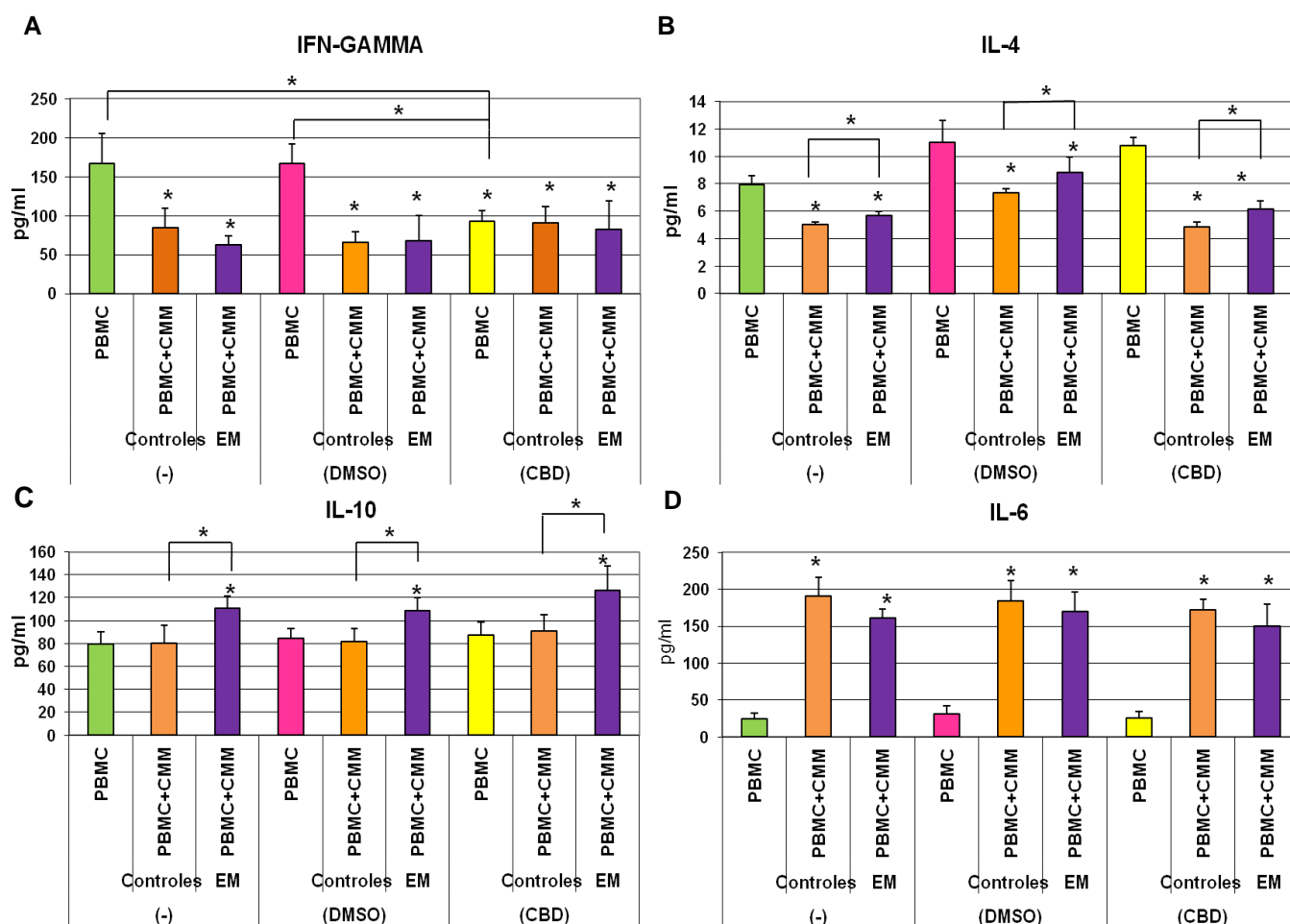


Figura 35. Análisis de citoquinas tras el tratamiento con compuestos cannabinoides. Se analizan por el ensayo colorimétrico ELISA las citoquinas IL-4 (A), IL-6 (B), IL-10 (C) e IFN- γ (D) de sobrenadantes de PBMC, estimuladas con PHA (20 μ g/ml) en presencia de CMM de controles sanos (naranja) y pacientes de EM (morado) tras el tratamiento con CBD (5 μ M) o su vehículo (DMSO) durante 72 horas a un ratio 1:20 (CMM:PBMC). Los datos representan n=3 experimentos independientes \pm Desvest.

En la **figura 35**, observamos que la producción de IFN- γ (A) disminuye en el cocultivo de CMM y PBMC estimuladas con PHA. Aunque no se detectan diferencias entre CMM de controles y pacientes, observamos una disminución de la producción de IFN- γ en las PBMC tratadas con CBD sin verse afectado por la presencia de CMM. Existe una disminución de la producción de IL-4 en el cocultivo con CMM, significativamente mayor en presencia de CMM de controles (B). En el cultivo de CMM de controles y PBMC estimuladas, existe una cantidad de proteína IL-10 (C) muy similar a la producida por las PBMC solas, sin embargo, la cantidad de proteína aumenta de manera significativa en presencia de CMM de pacientes. La producción de IL-6 aumenta de manera significativa en el cultivo de PBMC en presencia de CMM de controles y pacientes.

En conclusión, las CMM tienen la misma capacidad inmunomoduladora tras el tratamiento con CBD.

▪ Valorar la producción de factores neurotróficos

Mediante el ensayo colorimétrico ELISA se evalúa el efecto de los compuestos cannabinoides WIN, CBD y AEA en la producción de NGF por parte de las CMM de controles sanos y pacientes de EM tras 72 horas en cultivo.

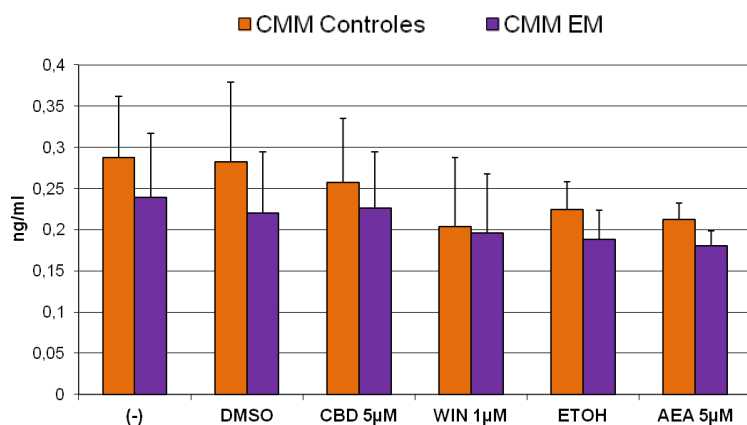


Figura 36. Producción del factor neurotrófico NGF por las CMM tras el tratamiento con cannabinoides. Se analiza mediante el ensayo colorimétrico ELISA la producción de NGF en los sobrenadantes de los cultivos de CMM de controles sanos (n=3) (**naranja**) y pacientes de EM (n=4) (**morado**) durante 72 horas a una concentración inicial de 1×10^4 células/cm² en condiciones normales (-), con los Vehículos (DMSO y ETOH) y con los distintos compuestos WIN (1µM), CBD (5µM) y AEA (5µM) tras 15 días en cultivo. Los datos representan la media de n=4 experimentos independientes \pm Desvest.

Como puede observarse en la **figura 36**, las CMM no ven modificada la producción de NGF tras el tratamiento con los distintos compuestos cannabinoides, independientemente de su procedencia (controles o pacientes).

6. DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

El potencial de neuroprotección, las propiedades de reparación y los resultados obtenidos en estudios *in vivo*, han justificado ensayos clínicos para explorar el uso de CMM autólogas administradas por vía *i.v* (Karussis *et al* 2010; Rice *et al* 2010; Connick *et al* 2011; Mohajeri *et al* 2011; Connick *et al* 2012) y vía *i.t* (Mohyeddin *et al* 2007; Karussis *et al* 2010; Yamout *et al* 2010) en EM. Sin embargo, cabe destacar que casi la totalidad de los ensayos clínicos con CMM para el tratamiento de la EM, se han realizado con CMM autólogas, mientras que en los estudios con EAE, se han utilizado CMM humanas procedentes de individuos sanos.

Los estudios realizados en otras enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso, artritis reumatoide y esclerosis sistémica (Nie *et al* 2010, Papadaki *et al* 2002; Larghero *et al* 2008) han sugerido que las CMM, en estas situaciones patológicas, pueden presentar alteraciones celulares derivadas de la enfermedad y cambios bioquímicos en el microambiente de la médula ósea, en cuanto a su potencial de diferenciación y sus funciones de soporte de la hematopoyesis estromal (Papadaki *et al* 2001; Papadaki *et al* 2002). Además, las CMM también podrían estar afectadas por terapias inmunomoduladoras previas como son mitoxantrona, interferón, ciclofosfamida o los corticoides, los cuales se ha visto que inhiben la proliferación de las CMM transitoriamente (Li 2004). Por otro lado, se han encontrado similitudes entre las CMM de pacientes de esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y las CMM de controles sanos en términos de cantidades obtenidas de la extracción y aislamiento, proliferación, inmunofenotipo y diferenciación (Ferrero 2008). En la misma línea, se ha demostrado que las CMM de pacientes de esclerosis sistémica, tienen un efecto anti proliferativo, sobre células inmunes *in vitro*, similar al de las CMM de controles sanos (Bocelli-Tyndal *et al* 2007). Estas investigaciones, muestran una gran variabilidad en los resultados obtenidos con CMM procedentes de individuos con otras enfermedades autoinmunes.

Si las CMM de individuos con EM son funcionalmente y/o fenotípicamente anormales, es una cuestión de vital importancia para saber si podemos extrapolar el potencial de las CMM como una posible terapia en EM con CMM autólogas. Previamente, se han estudiado la capacidad de soporte hematopoyético, el inmunofenotipo, las propiedades inmunológicas, la diferenciación y proliferación de las CMM de pacientes de EM (Papadaki *et al* 2005; Mazzanti *et al* 2008; Mallan *et al* 2010; De Oliveira *et al* 2013, Zafranskaya *et al* 2013). Sin embargo, los resultados al respecto de esta cuestión, son escasos y contradictorios en algunos aspectos.

En nuestro trabajo, cuando analizamos las características fenotípicas de las CMM, observamos que la morfología y la expresión de marcadores de superficie típicamente estudiados en CMM (CD31, CD34, CD45, CD73, CD80, CD90, CD105, CD166, HLA-I y HLA-DR), son similares en las CMM de controles y pacientes de EM (SP y RR). Además, nuestros datos demuestran que el potencial de diferenciación trilinear (adipogénesis, ósteogénesis y condrogénesis) y la capacidad proliferativa

(UFC) de las CMM de pacientes, no se encuentran modificadas con respecto a las CMM de controles. Asimismo, [De Oliveira et al 2013](#), observa capacidades de diferenciación adipogénica y osteogénica en CMM de pacientes de EM (SP, PP y RR) similares a las CMM de controles sanos. Sin embargo, este trabajo describe, que las CMM de pacientes presentan una apariencia senescente más prematura con una disminución en la expresión de los marcadores de superficie, aspectos que no observamos en nuestro trabajo, ni se detecta en trabajos anteriores. Nuestros resultados, estarían en línea con trabajos previos, en los que no detectan diferencias en morfología, potencial de expansión, capacidad para diferenciarse a adipocitos, osteocitos y condrocitos y expresión de marcadores fenotípicos, entre las CMM de pacientes (RR y SP) y controles sanos ([Mazzanti et al 2008](#) y [Mallan et al 2010](#)).

Con respecto al potencial inmunosupresor de las CMM, [Mazzanti et al 2008](#) determinaron que la actividad antiproliferativa era similar entre las CMM de controles sanos y pacientes de EM cuando son añadidas a cultivos de linfocitos activados. También, encontraron que en condiciones autólogas y alogénicas las CMM de pacientes de EM (SP, PP y RR), reducen significativamente la proliferación de las células T CD4 + estimuladas, del mismo modo que las CMM de controles sanos ([Zafranskaya et al 2013](#)). Nuestros resultados concluyen que la actividad antiproliferativa de las CMM es independiente de su procedencia (pacientes de EM o controles sanos) pero, si dependiente de su concentración, ya que a medida que aumentamos la concentración de CMM en el cocultivo con PBMC (ratios de 1:20 a 1:250), observamos mayor potencial antiproliferativo. Los datos que mostramos, demuestran que las CMM de pacientes presentan la misma capacidad antiproliferativa reduciendo la proliferación de PBMC estimuladas con PHA durante 3 días en cocultivo, tanto si las PBMC proceden de donantes sanos (heterólogas), como de los propios pacientes de EM (autólogas). Por lo tanto, los resultados que presentamos estarían en concordancia con trabajos anteriores ([Zafranskaya et al 2013](#); [Mazzanti et al 2008](#)), es más, en otras enfermedades autoinmunes, como la esclerosis sistémica, hay estudios que muestran que las CMM de pacientes y sanos fueron capaces de inhibir la proliferación de linfocitos autólogos o alogénicos de una manera dosis dependiente y que esta inhibición no estaba asociada con la actividad clínica de la enfermedad ([Bocelli-Tyndall et al 2007](#)). En nuestro trabajo no encontramos que el potencial inmunosupresor de las CMM esté asociado a ningún aspecto clínico de la enfermedad como es el grado de discapacidad (EDSS), la tasa anualizada de brotes (ARR), el número de brotes, lesiones, años de evolución o tratamientos previos.

Por el contrario, en el estudio de [De Oliveira et al 2013](#) se observa que las CMM de controles sanos, mostraron un mayor efecto antiproliferativo que las CMM de pacientes de EM, con una tasa de inhibición del 70% y el 50% respectivamente. Las posibles explicaciones a las diferencias de dichos resultados con respecto a estudios anteriores, podrían deberse a las condiciones experimentales elegidas, que pueden dificultar las comparaciones, como el número de pases de las

CMM (desde pase 0 hasta pase 5), los estímulos (PHA vs PMA) usados para la proliferación de los linfocitos, los tiempos (desde 3 hasta 6 días), las diferentes ratios (desde 1:10 hasta 1:1000) de cocultivo y los diferentes análisis de proliferación (MTT, CFSE). Por otro lado, estas discrepancias podrían estar relacionadas con los perfiles transcripcionales de genes relacionados con la actividad inmunosupresora de las CMM. En esta línea, [De Oliveira et al 2013](#) detectan que la modulación de la señalización de HGF (Hepatocyte Growth Factor) y la disminución de la expresión de los genes HGF y TGFB1 (Transforming growth factor beta 1), estarían relacionados con una menor capacidad antiproliferativa y disminución de la secreción de citoquinas antiinflamatorias (IL10, TGFβ) en los cocultivos con células de pacientes de EM. Sin embargo, también habría que tener en cuenta que el efecto inmunomodulador de las CMM puede depender de las propiedades intrínsecas de las células (terapias anteriores, salud y edad del donante, factores concomitantes, condiciones del cultivo celular y la expresión de moléculas y receptores implicados en la migración y quimiotaxis) así como el estado de actividad que presentan los linfocitos T ([Krampera et al 2007](#); [Newman et al 2009](#); [Payne et al 2012](#)). Los efectos de inmunoterapia previa en la funcionalidad y las propiedades de las CMM de pacientes, han sido considerados en estudios previos con enfermedades autoinmunes. Hay estudios que sugieren que dexametasona suprime la proliferación de las CMM transitoriamente ([Li J 2004](#)), sin embargo, medicaciones antirreumáticas como leflunomida, ciclosporina A, sulfasalazina A, hidroxicloroquina y D-penicilamina no se ha encontrado que tengan efecto sobre las CMM de pacientes con artritis reumatoide ([Kastrinaki 2008](#)). En esta línea, estudios en CMM de pacientes con EM no han encontrado ningún efecto con tratamientos previos con azatioprina, corticoides, mitoxantrona, interferon o ciclofosfamida ([Mazzanti et al 2008](#)). Por otro lado, con respecto a la actividad que presentan los linfocitos, hay autores que defienden que la capacidad de suprimir la proliferación inducida por mielina; correlaciona inversamente con el nivel de discapacidad de los pacientes, es decir, cuanto mayor es el grado de discapacidad del paciente (EDSS), menor es el potencial inmunosupresor de las CMM; debido posiblemente a la dominancia del proceso neurodegenerativo sobre la reacción autoinmune en estos pacientes ([Zafranskaya et al 2013](#)). Por otro lado, en algunas circunstancias, se ha observado una falta de correlación entre la habilidad de las CMM de MO para reducir la respuesta inmune *in vitro* y la habilidad para inducir mejoras clínicas *in vivo*. Este hecho, ya ha sido mencionado en estudios con otras enfermedades como injerto contra huésped ([Sudres et al 2006](#)), artritis inducida por colágeno ([Schurgers et al 2010](#)) y neuritis autoinmune experimental ([Sajic et al 2012](#)). Además, en la EAE, se ha observado que existen diferencias en la eficacia del tratamiento con CMM asociadas a la expresión de moléculas implicadas en la migración de las CMM ([Payne et al 2012](#)); lo que pone de manifiesto que otras propiedades de las CMM, como la eficacia para instalarse en los sitios de inflamación, debe ser crítico en la eficacia del trasplante de las mismas. Todo lo expuesto anteriormente, sugiere que es necesaria una investigación individualizada de las propiedades

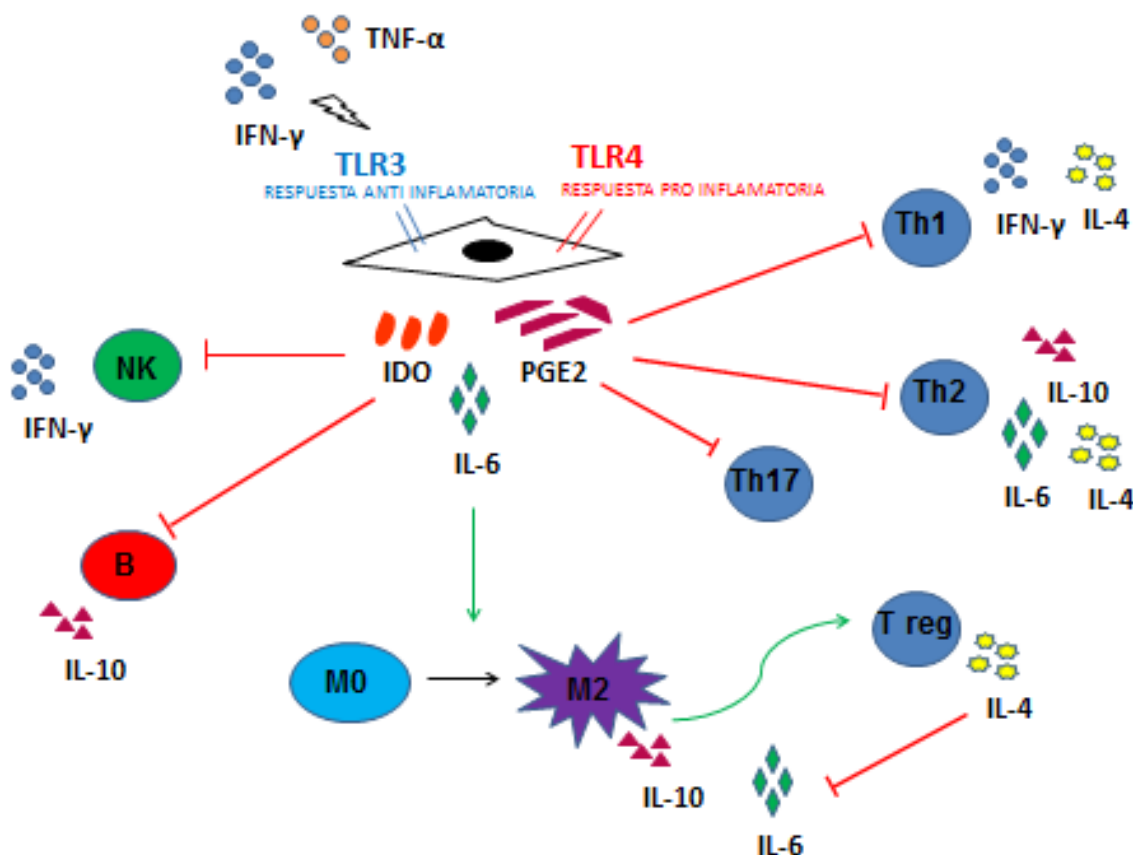
inmunomoduladoras de las CMM *in vitro*, para asegurar la eficacia del tratamiento autólogo como terapia para la EM (Singer *et al* 2011; Tyndall *et al* 2009).

Por otro lado, las CMM tienen la habilidad de suprimir la proliferación de las células activadas específicamente por mielina en EM, sin embargo, los mecanismos de inmunosupresión mediados por CMM varían entre especies diferentes, particularmente entre humanos y roedores (Lanz *et al* 2010). Por lo tanto, evaluamos la capacidad inmunosupresora de las CMM de controles y pacientes sobre las células encefalitógenas de ratón EAE, ya que uno de los objetivos más importantes de nuestro trabajo será realizar el tratamiento de la EAE con CMM humanas, de controles y pacientes. En nuestros resultados, mostramos una inhibición de la proliferación de células encefalitógenas similar por parte de las CMM de controles y pacientes de EM.

Además de las propiedades como progenitoras, las CMM presentan propiedades inmunorreguladoras ampliamente descritas en la literatura (Caplan *et al* 2007; Uccelli *et al* 2008), como la capacidad para inhibir la función de las células B, T y presentadoras de antígenos (APC), su implicación en la modulación de la función de las Treg y su capacidad de protección frente a las células T citotóxicas. Para estudiar estas propiedades en CMM procedentes de pacientes de EM, analizamos la producción de citoquinas (IL-4, IL-6, IL-10 e IFN- γ) en los sobrenadantes de cocultivos de PBMC en presencia de CMM de controles y pacientes mediante la técnica ELISA. Nuestros resultados muestran una disminución de la proliferación de PBMC en presencia de CMM de controles y pacientes de EM, que se correlaciona con una disminución de la producción de IFN- γ por parte de las PBMC, resultado que apoya los datos publicados por Zafranskaya *et al* 2013. En cuanto a IL-10, observamos un pequeño aumento, que no es tan notable como lo descrito en la literatura con CMM de controles sanos (Caplan *et al* 2007), posiblemente porque en nuestro estudio evaluamos la producción de citoquinas por PBMC y no sólo por linfocitos T, lo que sugiere que otros tipos celulares, como células B y macrófagos, estén implicados en la regulación de esta citoquina. Además, el aumento de IL-10 que observamos, se correlacionaría con la disminución de la producción de IL-4, ya que IL-10 actúa en la restauración de la producción de IL-4 por parte de linfocitos CD4 y CD8. Por otro lado, nuestros resultados parecen mostrar que la producción de IL-6 que observamos en el cocultivo de PBMC y CMM, se puede deber a la disminución de la producción de esta citoquina por parte de los macrófagos proinflamatorios y el aumento de su producción por parte de las CMM y las células Th2.

Nuestra conclusión, como puede observarse en el **esquema 5**, es que en un ambiente proinflamatorio producido por la estimulación de las PBMC, en el que existe un aumento de la presencia de citoquinas pro inflamatorias, como IFN- γ , las CMM se activan a través de receptores TLR3 (Lai *et al* 1996), adquiriendo un perfil anti inflamatorio. De esta forma, las CMM producenIDO (indolamina 2,3-dioxigenasa), PGE2 e IL-6 lo que polariza los monocitos (MO) hacia macrófagos

anti inflamatorios productores de IL-10 (M2); bloquea la diferenciación y maduración de las células dendríticas (Uccelli *et al* 2008), que inhibe de forma indirecta a los linfocitos y provoca un aumento de la producción de IL-10 y una disminución de IFN- γ (Gur-Wahnon *et al* 2007) que modula las rutas de diferenciación de las Treg y Th17; y favorecen la producción de Treg, aumentando la



Esquema 5: Papel inmunorregulador de las CMM en un ambiente proinflamatorio producido por la estimulación de PBMC.

producción de IL-4 por parte de las células T CD4 y CD8 (Caplan *et al* 2007).

Por todo lo expuesto anteriormente destacamos que las CMM de pacientes de EM y controles presentan las mismas capacidades inmunomoduladoras, lo que estaría en la línea de lo expuesto en un trabajo previo, donde observan que las CMM de pacientes de EM expresan los mismos receptores TLR y por lo tanto presentan las misma capacidad inmunosupresora e inhibitoria sobre la diferenciación y activación de las células dendríticas (Mazzanti *et al* 2008).

Los tratamientos inmunomoduladores en EM, intervienen en el proceso inflamatorio y pueden reducir en un porcentaje moderado la ratio de brotes y la progresión de la discapacidad; sin embargo, presentan una eficacia baja o nula en las fases progresivas de la enfermedad, cuando la neurodegeneración y el daño axonal se encuentran avanzados, y además, en ocasiones se pueden

observar alta toxicidad y efectos neurológicos adversos, tras el tratamiento (Novak *et al* 2008; Vosoughi *et al* 2010; Racke *et al* 2011). Por ello, toman importancia las terapias celulares con CMM ya que promueven la reparación neuronal, la neuroprotección y modulan la respuesta inmune tanto *in vivo* como *in vitro* (Mahmood A *et al* 2004).

El trasplante autólogo de CMM de médula ósea, es el método más extendido dentro del tratamiento con CMM en EM (Freedman *et al* 2010). En este aspecto, las CMM de médula ósea procedentes del propio paciente son expandidas *in vitro*, hasta conseguir un número adecuado de células, para ser trasplantadas en el propio paciente. Además, ensayos clínicos donde CMM autólogas han sido administradas por vía i.t (Mohyeddin Bonab *et al* 2007, Karussis *et al* 2010; Yamout *et al* 2010) e *i.v* (Karussis *et al* 2010; Rice *et al* 2010, Connick *et al* 2011; Mohajeri *et al* 2011, Connick *et al* 2012) en pacientes de EM, han demostrado la seguridad de estos procedimientos en cuestiones de onco e inmunogenicidad. El potencial beneficioso de las CMM en el tratamiento de la EM ha sido demostrado, en estudios preliminares en EAE, en los que se observó, que la administración sistémica de CMM de médula ósea, puede modular las respuestas inmunes induciendo tolerancia periférica y disminuyendo la enfermedad tras la administración de CMM por vías *i.v* (Gerdoni *et al* 2007; Zappia *et al* 2005; Bai *et al* 2009; Kassiss *et al* 2008; Gordon *et al* 2010; Payne *et al* 2012), *i.p* (Gordon *et al* 2008; Rafei *et al* 2009; Rafei *et al* 2009) e intracerebroventricular (*icv*) (Yael Barhum *et al* 2009). En la totalidad de los estudios experimentales con EAE, se han utilizado CMM singénicas, alogénicas y xenogénicas, todas ellas procedentes de donantes sanos. Además, en la literatura existe aún controversia, en cuanto si las CMM de pacientes de EM, presentan las mismas características fenotípicas y funcionales, que las CMM procedentes de individuos sanos, *in vitro* (Papadaki *et al* 2005; Mazzanti *et al* 2008; Mallan *et al* 2010; De Oliveira *et al* 2013, Zafranskaya *et al* 2013); y sobre todo, existe un gran desconocimiento, ya que no existen estudios, respecto a la eficacia terapéutica de las CMM de pacientes de EM *in vivo*, en el modelo murino de EAE.

Por primera vez, nuestros resultados demuestran que las CMM de pacientes de EM, presentan el mismo potencial terapéutico que las células procedentes de donantes sanos en el modelo murino EAE. La administración de CMM de pacientes de EM disminuyen los signos clínicos, y aspectos como la inflamación, desmielinización y daño axonal de la EAE, con la misma eficacia que las CMM procedentes de controles. En la misma dirección, un estudio previo (Kassiss *et al* 2013), demuestra que las CMM procedentes de la médula ósea de ratones EAE, reducen las manifestaciones clinicopatológicas de la EAE e inducen un efecto protector en los axones, con un patrón similar al de las CMM procedentes de ratones sanos. Estos resultados constatan que el proceso inflamatorio de la EM no ejerce ningún efecto en las propiedades biológicas y funcionales de las CMM. Además, se trata de un soporte importante para el uso del trasplante autólogo de CMM de médula ósea, en pacientes de EM.

Por otro lado, nuestros resultados muestran que el efecto terapéutico de las células está muy relacionado con el momento de administración a lo largo del desarrollo de la EAE, y por lo tanto con los diferentes estadios inflamatorios de la enfermedad. El tratamiento con CMM en la EAE, es más efectivo cuando son administradas en días tempranos (0, 2 y 7 DPI) del desarrollo de la enfermedad, lo que concuerda con publicaciones anteriores (Zappia *et al* 2005; Kurte *et al* 2015); que muestran que el trasplante de CMM como tratamiento en la EAE sólo es efectivo cuando son administradas antes del inicio de los signos clínicos o antes de alcanzar el máximo grado de la enfermedad, pero no cuando la enfermedad alcanza la fase crónica. Cuando las células son administradas en el momento de mayor grado de discapacidad o en la fase de estabilización de la EAE, no observamos una disminución de los signos clínicos y en ocasiones observamos animales con signos clínicos atípicos como fallos motores y desequilibrios al andar, de acuerdo con lo descrito previamente (Domingues *et al* 2010; Kurte *et al* 2015). Estas diferencias pueden deberse a que la potencia inmunosupresora de las CMM está condicionada por el microambiente inflamatorio que existe cuando son administradas (Kamprera *et al* 2011). La falta de eficacia de las CMM cuando son administraciones tras el inicio de los signos clínicos y la aparición de signos clínicos atípicos podrían tener su explicación en que quizá las CMM son menos eficaces cuando la inflamación cerebral es máxima, perdiendo su potencia inmunosupresora, como parecería razonable; o quizá debido a una pérdida de tolerancia inmunológica de las CMM, la cual se ha observado que es dependiente de altos niveles de citoquinas proinflamatorias producidas por las células Th17 y Th1 (Kamprera *et al* 2011; Luz-Crawford *et al* 2013), que en fases posteriores del desarrollo de la EAE se encuentran en niveles inferiores con respecto al inicio de los signos clínicos; al contrario que ocurre con las citoquinas producidas por células Treg (IL-27) que se detectan elevadas (Hunter *et al* 2012; Kurte *et al* 2015); pudiendo hacer que las CMM inoculadas en estas fases pierdan el inmunoprivilegio que las caracteriza.

También observamos que la vía de administración de las células es un factor determinante en el tratamiento. Nuestros experimentos muestran como vía de administración ideal, la vía i.v, con la que observamos un mayor efecto terapéutico y mayor reproducibilidad en los resultados. Por el contrario, otros trabajos que comparan las vías de administración i.v e i.p; no observan diferencias entre ambas (Yousefi *et al* 2013), u obtienen mejores resultados con la vía i.p (Payne *et al* 2012); si bien cabe reseñar que se tratan de CMM de diferente procedencia y con diferentes protocolos de tratamiento (distinto número de células, diferentes dosis y días de tratamiento). Además, hay que destacar que también es importante el número de células administradas, ya que hay que encontrar el equilibrio entre intolerancia y eficacia terapéutica. Durante nuestros tratamientos, los ratones no admitieron una concentración superior a los 2 millones de células en una sola dosis, y en el caso de varias administraciones, no se puede superar el 1.5 millones de células por infusión, pudiendo llegar a un total de 4 millones de células administradas en varias infusiones. Esto se debe

principalmente a que cuando inoculamos las CMM por vía i.v, la mayoría de las células se retienen en el pulmón (Jizong Gao *et al* 2001), ya que el diámetro de las células es mayor que el de los capilares pulmonares. De hecho, los problemas respiratorios, son una de las mayores complicaciones que aparecen después del trasplante de CMM en la práctica clínica (Crawford y Petersen 1992; Bojko *et al* 1999). Podemos concluir que, para mejorar la eficacia terapéutica de las CMM en la EAE, es importante evaluar aspectos como la dosis de células inoculadas, el tiempo, la frecuencia y la vía de administración.

Como ya se ha mencionado anteriormente, un extenso cuerpo de literatura aborda la vía del sistema cannabinoide como un nuevo camino en el tratamiento de la EM. Por ello analizamos la expresión de los receptores CB₁ y CB₂ en la médula ósea de los ratones por microscopía confocal. Nuestros resultados muestran un aumento de la expresión de CB₂ y una disminución de CB₁ en la médula de ratones EAE; mientras que los ratones tratados con CMM presentan niveles similares a los de los ratones sanos. Este comportamiento de CB₁ y CB₂, está de acuerdo con los datos mostrados por otros autores (Lou *et al* 2012; 2011a; 2011b), siendo el resultado del aumento de infiltración celular (más CB₂) y la pérdida de microglía (menos CB₁) en la médula de los ratones EAE. Estos resultados, ponen de manifiesto la importancia y presencia del sistema cannabinoide en los procesos de inflamación y desmielinización de la EAE y la EM.

Los receptores de cannabinoides se expresan y funcionan desde etapas muy tempranas del desarrollo donde regulan varias cascadas de quinasas relacionadas con la supervivencia y proliferación celular con principales consecuencias en el potencial de decisión de las células progenitoras (las rutas PI3K/PKB y ERK) (Galve-Roperh-2013). Estudios recientes, han puesto de manifiesto que las células del estroma de la médula ósea, sintetizan y liberan eCBs “a demanda”, y expresan sus receptores específicos CB₁ y CB₂, como mediadores de la migración, proliferación y diferenciación de las células madre hematopoyéticas, adipocitos, osteoblastos/osteoclastos y células epiteliales (Jiang *et al* 2011a; 2011b).

En cuanto a las CMM humanas de MO, existe un conocimiento muy escaso de la presencia y regulación del SEC y su posible papel en la actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora de las mismas. Los limitados estudios que existen se han llevado a cabo utilizando CMM de donantes sanos, por lo que hasta la fecha no se ha recogido si, como en otros tipos celulares, existen diferencias en la expresión del SEC en las células de pacientes de EM. En este sentido, Jean-Gilles *et al* 2015, observan que en PBMC, los receptores CB₁ y CB₂ aumentan su expresión tras el estímulo con citoquinas proinflamatorias y se detecta una mayor expresión de CB₁ y CB₂ en PBMC de pacientes de EM con respecto a controles sanos, lo que significa que existe un aumento de los receptores en condiciones inflamatorias. También, un trabajo reciente de nuestro laboratorio, ha demostrado que en las PBMC de pacientes de EM, CB₁ y CB₂ se encuentran en niveles de

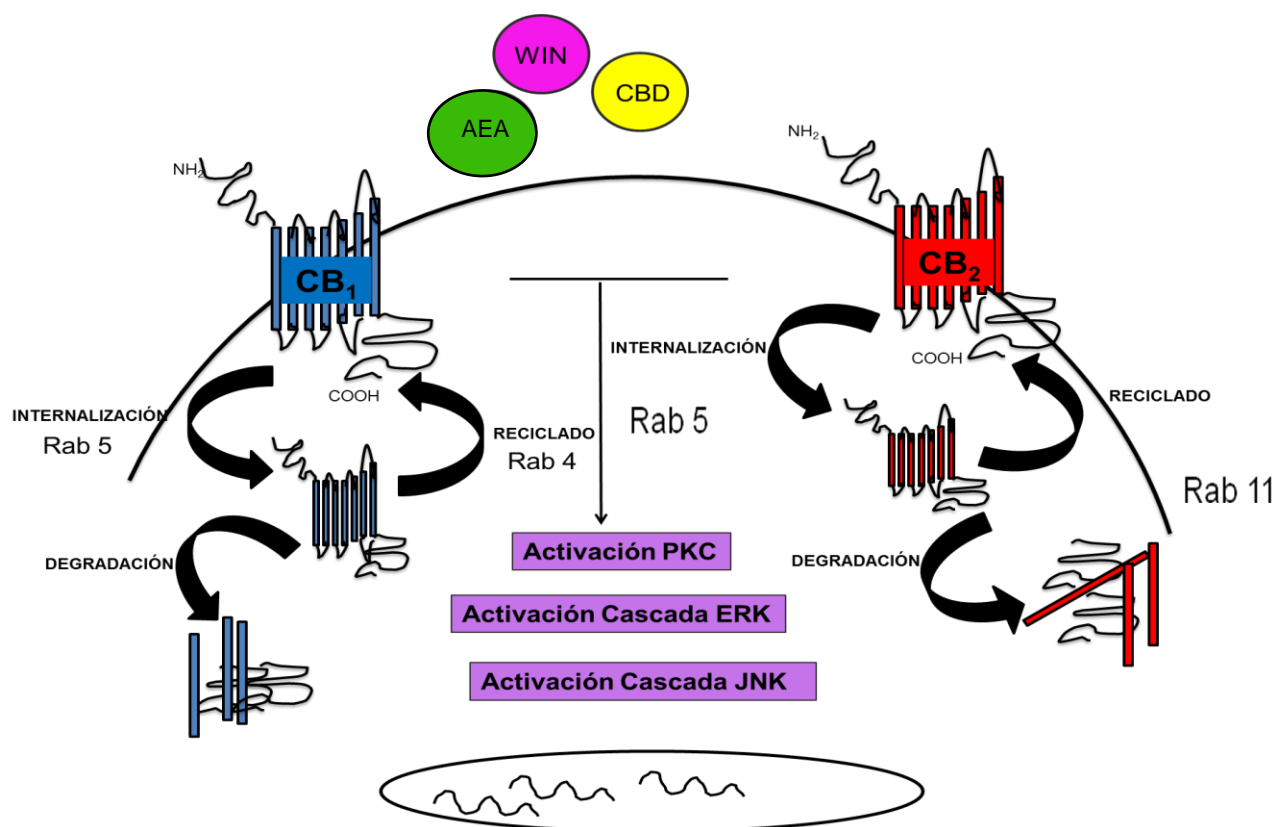
expresión superiores a los encontrados en PBMC de controles; y además su expresión es regulada por el tratamiento con IFN- β , disminuyendo la expresión de CB₁ y CB₂ en pacientes tratados a los 6 y 12 meses (Sánchez López *et al* 2014), lo que pone de manifiesto su papel como diana terapéutica o marcador de eficacia de tratamiento.

En estudios anteriores con CMM humanas, Rossi *et al* 2013 analizan la expresión de los receptores CB₁ y CB₂ en CMM de MO; y observan que la expresión de CB₂ aumenta con los meses mientras que CB₁ es inversamente proporcional. Por otro lado, en el trabajo de Schmuhl *et al* 2013, los resultados muestran la expresión de los receptores CB₁, CB₂, TRPV1 y GPR55 en fracciones de membrana de las CMM de tejido adiposo. Por su parte, Yong-Xin *et al* 2014, sólo detectan ARNm y proteína del receptor CB₂ en CMM; y Seyeon *et al* 2015 tan sólo observan la expresión de ARNm de los receptores CB₁ y TRPV1 en las CMM. Todos estos trabajos anteriores, demuestran la implicación de los receptores de cannabinoides como mediadores de la supervivencia, la osteogénesis, la adipogénesis, las propiedades inmunomoduladoras y la capacidad migratoria de las CMM, pero quizá debido a diferentes aspectos como el origen de las células (adiposo, umbilical o médula ósea) y las metodologías utilizadas, muestran resultados diferentes.

En este trabajo por primera vez, comparamos elementos fundamentales del sistema endocannabinoide en CMM procedentes de pacientes de EM y controles. Cuando analizamos la expresión de CB₁, CB₂ y FAAH por qPCR, observamos que los niveles de ARNm para los tres genes son muy bajos pero similares en las CMM de controles y pacientes de EM. Al analizar la expresión a nivel de proteína, observamos, que los receptores CB₁ y CB₂ se encuentran en concentraciones bajas en la superficie celular; y que dicha expresión aumenta significativamente en la superficie de las CMM de pacientes de EM, para ambos receptores. Sin embargo, cuando analizamos los niveles de proteína intracelular detectamos niveles muy altos de ambos receptores, sin encontrar diferencias entre CMM de controles y pacientes.

Nuestros resultados muestran similitud, en la expresión de los receptores CB₁ y CB₂ a nivel de proteína, con trabajos previos con CMM de donantes sanos (Rossi *et al* 2013), sin embargo, por primera vez mostramos, que las CMM de pacientes de EM tienen mayores niveles de expresión de ambos receptores en superficie. Este hecho, se ha observado con otros tipos celulares (PBMC) procedentes de pacientes de EM (Jean-Gilles *et al* 2015; Sánchez López *et al* 2014). Esta diferencia de expresión, podría deberse a que las CMM de los pacientes de EM, se encuentran en un ambiente inflamatorio con una alta concentración de citoquinas proinflamatorias y endocannabinoides (Maresz *et al* 2005; Jean-Gilles *et al* 2009), que actúan como ligandos para CB₁ y CB₂, y provocan un aumento de expresión de los mismos “a demanda”. Sin embargo, cuando analizamos la localización celular de los receptores, observamos que CB₁ y CB₂ se encuentran de forma predominante en el interior celular, independientemente de la procedencia de las CMM

(controles y pacientes de EM). Estas diferencias de expresión intracelular y extracelular de los receptores de cannabinoides, han sido descritas en estudios previos con CB₂ en PBMC de donantes sanos (Castaneda *et al* 2014) y CB₁ en neuronas (Rozenfeld *et al* 2011). La prevalencia intracelular de ambos receptores en las CMM, podría deberse a que durante el cultivo y la expansión celular, existe la ausencia de ligandos y un ambiente condicionante, que propician la expresión de estos receptores, lo cual produce la internalización de los mismos, que se encontrarían secuestrados en el citoplasma, para los procesos de reciclado y/o degradación mediados por las proteínas Rab (Van der Sluijs *et al* 1992; Leterrier *et al* 2004; Grimsey *et al* 2011) como puede observarse en el **esquema 6**. Este hecho, además explicaría la baja expresión génica detectada por qPCR para ambos receptores; y la falta de diferencias en los niveles de ambas proteínas, en su localización intracelular, entre controles y pacientes de EM.



Esquema 6: Proceso de activación, internalización, reciclado y degradación de los receptores de cannabinoides.

Debido al papel neuroprotector e inmunomodulador de los cannabinoides, estos compuestos se han tomado en cuenta como buenos candidatos en las estrategias terapéuticas de la EM. Uno de los usos clínicos de los cannabinoides está en el tratamiento sintomático de la EM, proporcionando efectos beneficiosos en espasticidad y dolor (Wade *et al* 2006; Smith 2007). La investigación con cannabinoides en el tratamiento de EM va en aumento, no sólo por su papel en los síntomas de la

enfermedad, sino porque además existen datos que apoyan su potencial terapéutico para ralentizar la progresión de la enfermedad y su importancia en la reparación del sistema nervioso central.

Tras caracterizar los receptores CB₁ y CB₂ en las CMM de controles y pacientes, estudiamos el posible papel de los cannabinoides sobre sus características fenotípicas y funcionales. En trabajos anteriores, encuentran que tras el tratamiento con CBD y agonistas del receptor de CB₂ (JWH-133, UR-144), se potencia la capacidad migratoria de las CMM de una manera dosis dependiente (Schmuhl *et al* 2013), las CMM se vuelven más resistentes a señales apoptóticas, más activas metabólicamente y más receptivas a estímulos externos (Rossi *et al* 2013) y se activa la diferenciación hacia osteocitos (Yong –Xin *et al* 2014). Por otro lado, se observa un aumento del receptor y una inhibición de la adipogénesis en CMM, tras el tratamiento con los cannabinoides endógenos AEA y NADA, respectivamente (Seyeon *et al* 2015).

Los datos de nuestro trabajo muestran que el tratamiento con WIN, CBD y AEA no produce ningún efecto sobre el inmunofenotipo, la capacidad formadora de colonias (UFC), los procesos de adipogénesis, osteogénesis y condrogénesis, la actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora y la producción del factor neurotrófico NGF, de las CMM de controles y pacientes de EM. La falta de efecto de estos cannabinoides sobre las CMM, podría deberse a que ambos receptores se encuentran principalmente en el citoplasma, como consecuencia de las condiciones de cultivo; lo que puede contribuir de forma fundamental a que los ligandos no generen una respuesta efectiva. Asimismo, a esta incapacidad de respuesta de los receptores intracelulares se puede sumar, que los receptores que se encuentran en la superficie no sean suficientes para producir una respuesta y que tras su activación se internalizan; y debido a la exposición continua al ligando lo hacen de forma permanente como mecanismo adaptativo (desensibilización) (García Sáinz 2011). Por otro lado, se ha mostrado que dependiendo de la localización celular de los receptores se activan diferentes rutas de señalización (Brailoiu *et al* 2011; Rozenfeld *et al* 2011; Howlett *et al* 2005); por lo que puede que las rutas activadas no estén implicadas ni regulen, los aspectos analizados en nuestro estudio.

Este trabajo en su conjunto aporta datos que apoyan el uso de CMM autólogas en el tratamiento de la EM, y aporta información hasta ahora desconocida sobre el SEC y el efecto del tratamiento con cannabinoides en las CMM de controles y pacientes de EM

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

- Las CMM de pacientes de EM presentan características fenotípicas y funcionales, *in vitro*, similares a las de sujetos control.
- La inoculación de 2×10^6 CMM distribuidas en 3 infusiones por vía i.v en días anteriores al inicio de los signos clínicos, disminuye la escala de discapacidad en ratones EAE.
- Las CMM de pacientes de EM disminuyen la EAE, reduciendo los signos clínicos y los aspectos histológicos más relevantes, del mismo modo que las CMM de controles.
- Detectamos la presencia de los receptores CB₁ y CB₂ en las CMM de controles y pacientes de EM.
- Los receptores CB₁ y CB₂ se encuentran predominantemente en el interior de las CMM sin detectar diferencias de expresión entre las CMM de controles y pacientes de EM.
- La expresión de CB₁ y CB₂ en la superficie de las CMM es mayor en pacientes de EM que en las CMM de controles sanos.
- El tratamiento de las CMM con diferentes cannabinoides endógenos (AEA) y exógenos (CBD y WIN), no modifica su respuesta *in vitro*.

8. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Acha-Orbea, H., D. J. Mitchell, L. Timmermann, D. C. Wraith, G. S. Tausch, M. K. Waldor, S. S. Zamvil, H. O. McDevitt, and L. Steinman. "Limited Heterogeneity of T Cell Receptors from Lymphocytes Mediating Autoimmune Encephalomyelitis Allows Specific Immune Intervention." *Cell* 54, no. 2 (July 15, 1988): 263–73.
- Ahn, Seyeon, Sodam Yi, Won Jong Seo, Myeong Jung Lee, Young Keun Song, Seung Yong Baek, Jinha Yu, et al. "A Cannabinoid Receptor Agonist N-Arachidonoyl Dopamine Inhibits Adipocyte Differentiation in Human Mesenchymal Stem Cells." *Biomolecules & Therapeutics* 23, no. 3 (May 2015): 218–24. doi:10.4062/biomolther.2014.137.
- Albert, L. J., and R. D. Inman. "Molecular Mimicry and Autoimmunity." *The New England Journal of Medicine* 341, no. 27 (December 30, 1999): 2068–74. doi:10.1056/NEJM199912303412707.
- Arimilli, S., W. Ferlin, N. Solvason, S. Deshpande, M. Howard, and S. Mocci. "Chemokines in Autoimmune Diseases." *Immunological Reviews* 177 (October 2000): 43–51.
- Arnold, D. L., and N. De Stefano. "Preventing Brain Atrophy Should Be the Gold Standard of Effective Therapy in Multiple Sclerosis (after the First Year of Treatment): Commentary." *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 19, no. 8 (July 2013): 1007–8. doi:10.1177/1352458513490550.
- Atwood, Brady K., and Ken Mackie. "CB2: A Cannabinoid Receptor with an Identity Crisis." *British Journal of Pharmacology* 160, no. 3 (June 2010): 467–79. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00729.x.
- Bai, Lianhua, Donald P. Lennon, Valerie Eaton, Kari Maier, Arnold I. Caplan, Stephen D. Miller, and Robert H. Miller. "Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Induce Th2-Polarized Immune Response and Promote Endogenous Repair in Animal Models of Multiple Sclerosis." *Glia* 57, no. 11 (August 15, 2009): 1192–1203. doi:10.1002/glia.20841.
- Baker, D., G. Pryce, J. L. Croxford, P. Brown, R. G. Pertwee, J. W. Huffman, and L. Layward. "Cannabinoids Control Spasticity and Tremor in a Multiple Sclerosis Model." *Nature* 404, no. 6773 (March 2, 2000): 84–87. doi:10.1038/35003583.
- Baker, D., G. Pryce, J. L. Croxford, P. Brown, R. G. Pertwee, A. Makriyannis, A. Khanolkar, et al. "Endocannabinoids Control Spasticity in a Multiple Sclerosis Model." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15, no. 2 (February 2001): 300–302. doi:10.1096/fj.00-0399fje.
- Barhum, Yael, Sharon Gai-Castro, Merav Bahat-Stromza, Ran Barzilay, Eldad Melamed, and Daniel Offen. "Intracerebroventricular Transplantation of Human Mesenchymal Stem Cells Induced to Secrete Neurotrophic Factors Attenuates Clinical Symptoms in a Mouse Model of Multiple Sclerosis." *Journal of Molecular Neuroscience: MN* 41, no. 1 (May 2010): 129–37. doi:10.1007/s12031-009-9302-8.
- Bari, Monica, Natalia Battista, Filomena Fezza, Alessandro Finazzi-Agrò, and Mauro Maccarrone. "Lipid Rafts Control Signaling of Type-1 Cannabinoid Receptors in Neuronal Cells. Implications for Anandamide-Induced Apoptosis." *The Journal of Biological Chemistry* 280, no. 13 (April 1, 2005): 12212–20. doi:10.1074/jbc.M411642200.
- Bari, Monica, Marianna Tedesco, Natalia Battista, Nicoletta Pasquariello, Mariangela Pucci, Valeria Gasperi, Maria Lucia Scaldaferrì, Donatella Farini, Massimo De Felici, and Mauro Maccarrone. "Characterization of the Endocannabinoid System in Mouse Embryonic Stem Cells." *Stem Cells and Development* 20, no. 1 (January 2011): 139–47. doi:10.1089/scd.2009.0515.
- Bartholomew, Amelia, Cord Sturgeon, Mandy Siatskas, Karen Ferrer, Kevin McIntosh, Sheila Patil, Wayne Hardy, et al. "Mesenchymal Stem Cells Suppress Lymphocyte Proliferation in Vitro and Prolong Skin Graft Survival in Vivo." *Experimental Hematology* 30, no. 1 (January 2002): 42–48.

- Baxter, Alan G. "The Origin and Application of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis." *Nature Reviews. Immunology* 7, no. 11 (November 2007): 904–12. doi:10.1038/nri2190.
- Ben-Hur, Tamir, Nina Fainstein, and Yossi Nishri. "Cell-Based Reparative Therapies for Multiple Sclerosis." *Current Neurology and Neuroscience Reports* 13, no. 11 (November 2013): 397. doi:10.1007/s11910-013-0397-5.
- Berger, Thomas, Paul Rubner, Franz Schautzer, Robert Egg, Hanno Ulmer, Irmgard Mayringer, Erika Dilitz, Florian Deisenhammer, and Markus Reindl. "Antimyelin Antibodies as a Predictor of Clinically Definite Multiple Sclerosis after a First Demyelinating Event." *The New England Journal of Medicine* 349, no. 2 (July 10, 2003): 139–45. doi:10.1056/NEJMoa022328.
- Bisicchia, Elisa, Valerio Chiurchiù, Maria Teresa Viscomi, Laura Latini, Filomena Fezza, Luca Battistini, Mauro Maccarrone, and Marco Molinari. "Activation of Type-2 Cannabinoid Receptor Inhibits Neuroprotective and Antiinflammatory Actions of Glucocorticoid Receptor A: When One Is Better than Two." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 70, no. 12 (June 2013): 2191–2204. doi:10.1007/s00018-012-1253-5.
- Black, I. B., and D. Woodbury. "Adult Rat and Human Bone Marrow Stromal Stem Cells Differentiate into Neurons." *Blood Cells, Molecules & Diseases* 27, no. 3 (June 2001): 632–36. doi:10.1006/bcmd.2001.0423.
- Bocelli-Tyndall, C., L. Bracci, G. Spagnoli, A. Braccini, M. Bouchenaki, R. Ceredig, V. Pistoia, I. Martin, and A. Tyndall. "Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells (BM-MSCs) from Healthy Donors and Auto-Immune Disease Patients Reduce the Proliferation of Autologous- and Allogeneic-Stimulated Lymphocytes in Vitro." *Rheumatology (Oxford, England)* 46, no. 3 (March 2007): 403–8. doi:10.1093/rheumatology/kel267.
- Bojko, T., and D. A. Notterman. "Reversal of Fortune? Respiratory Failure after Bone Marrow Transplantation." *Critical Care Medicine* 27, no. 6 (June 1999): 1061–62.
- Bossolasco, P., L. Cova, C. Calzarossa, S. G. Rimoldi, C. Borsotti, G. Lambertenghi Delilieri, V. Silani, D. Soligo, and E. Polli. "Neuro-Glial Differentiation of Human Bone Marrow Stem Cells in Vitro." *Experimental Neurology* 193, no. 2 (June 2005): 312–25. doi:10.1016/j.expneurol.2004.12.013.
- Bouaboula, M., D. Dussosoy, and P. Casellas. "Regulation of Peripheral Cannabinoid Receptor CB2 Phosphorylation by the Inverse Agonist SR 144528. Implications for Receptor Biological Responses." *The Journal of Biological Chemistry* 274, no. 29 (July 16, 1999): 20397–405.
- Brailoiu, G. Cristina, Tudor I. Oprea, Pingwei Zhao, Mary E. Abood, and Eugen Brailoiu. "Intracellular Cannabinoid Type 1 (CB1) Receptors Are Activated by Anandamide." *The Journal of Biological Chemistry* 286, no. 33 (August 19, 2011): 29166–74. doi:10.1074/jbc.M110.217463.
- Broadley, Simon A., Michael H. Barnett, Mike Boggild, Bruce J. Brew, Helmut Butzkueven, Robert Heard, Suzanne Hodgkinson, et al. "Therapeutic Approaches to Disease Modifying Therapy for Multiple Sclerosis in Adults: An Australian and New Zealand Perspective: Part 1 Historical and Established Therapies. MS Neurology Group of the Australian and New Zealand Association of Neurologists." *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 21, no. 11 (November 2014): 1835–46. doi:10.1016/j.jocn.2014.01.016.
- Brocke, S., C. Piercy, and L. Steinman. "Superantigens in Demyelinating Disease." *Springer Seminars in Immunopathology* 18, no. 1 (1996): 51–56.
- Caplan, A. I. "Mesenchymal Stem Cells." *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society* 9, no. 5 (September 1991): 641–50. doi:10.1002/jor.1100090504.
- Caplan, Arnold I. "Adult Mesenchymal Stem Cells for Tissue Engineering versus Regenerative

- Medicine.” *Journal of Cellular Physiology* 213, no. 2 (November 2007): 341–47. doi:10.1002/jcp.21200.
- Carlo-Stella, Carmelo, Massimo Di Nicola, and Massimo A. Gianni. “[Mesenchymal stem cells: biology and clinical applications].” *Tumori* 88, no. 6 (December 2002): A4–7.
- Carreon-Guarnizo, E., E. Andreu-Reinon, M. Cerdan-Sanchez, R. Carrasco-Torres, R. Hernandez-Clares, L. Prieto-Valiente, C. Garcia-Escriba, et al. “[Prevalence of multiple sclerosis in the Region of Murcia].” *Revista De Neurologia* 62, no. 9 (May 1, 2016): 396–402.
- Casiraghi, Federica, Norberto Perico, and Giuseppe Remuzzi. “Mesenchymal Stromal Cells to Promote Solid Organ Transplantation Tolerance.” *Current Opinion in Organ Transplantation* 18, no. 1 (February 2013): 51–58. doi:10.1097/MOT.0b013e32835c5016.
- Castaneda, Julie T., Airi Harui, Sylvia M. Kiertscher, Jeffrey D. Roth, and Michael D. Roth. “Differential Expression of Intracellular and Extracellular CB(2) Cannabinoid Receptor Protein by Human Peripheral Blood Leukocytes.” *Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 8, no. 1 (March 2013): 323–32. doi:10.1007/s11481-012-9430-8.
- Castillo, Pablo E., Thomas J. Younts, Andrés E. Chávez, and Yuki Hashimoto-dani. “Endocannabinoid Signaling and Synaptic Function.” *Neuron* 76, no. 1 (October 4, 2012): 70–81. doi:10.1016/j.neuron.2012.09.020.
- Cencioni, Maria Teresa, Valerio Chiurchiù, Giuseppina Catanzaro, Giovanna Borsellino, Giorgio Bernardi, Luca Battistini, and Mauro Maccarrone. “Anandamide Suppresses Proliferation and Cytokine Release from Primary Human T-Lymphocytes Mainly via CB2 Receptors.” *PloS One* 5, no. 1 (2010): e8688. doi:10.1371/journal.pone.0008688.
- Chern, C. J., and E. Beutler. “Biochemical and Electrophoretic Studies of Erythrocyte Pyridoxine Kinase in White and Black Americans.” *American Journal of Human Genetics* 28, no. 1 (January 1976): 9–17.
- Cogle, Christopher R., Anthony T. Yachnis, Eric D. Laywell, Dani S. Zander, John R. Wingard, Dennis A. Steindler, and Edward W. Scott. “Bone Marrow Transdifferentiation in Brain after Transplantation: A Retrospective Study.” *Lancet (London, England)* 363, no. 9419 (May 1, 2004): 1432–37. doi:10.1016/S0140-6736(04)16102-3.
- Compagnucci, Claudia, Sara Di Siena, Maria Blaire Bustamante, Daniele Di Giacomo, Monia Di Tommaso, Mauro Maccarrone, Paola Grimaldi, and Claudio Sette. “Type-1 (CB1) Cannabinoid Receptor Promotes Neuronal Differentiation and Maturation of Neural Stem Cells.” *PloS One* 8, no. 1 (2013): e54271. doi:10.1371/journal.pone.0054271.
- Compston, Alastair, and Alasdair Coles. “Multiple Sclerosis.” *Lancet (London, England)* 372, no. 9648 (October 25, 2008): 1502–17. doi:10.1016/S0140-6736(08)61620-7.
- Confavreux, C., M. Hutchinson, M. Hours, P. Cortinovis-Tourniaire, J. Grimaud, and T. Moreau. “[Multiple sclerosis and pregnancy: clinical issues].” *Revue Neurologique* 155, no. 3 (March 1999): 186–91.
- Connick, Peter, Madhan Kolappan, Charles Crawley, Daniel J. Webber, Rickie Patani, Andrew W. Mitchell, Ming-Qing Du, et al. “Autologous Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Secondary Progressive Multiple Sclerosis: An Open-Label Phase 2a Proof-of-Concept Study.” *The Lancet. Neurology* 11, no. 2 (February 2012): 150–56. doi:10.1016/S1474-4422(11)70305-2.
- Connick, Peter, Madhan Kolappan, Rickie Patani, Michael A. Scott, Charles Crawley, Xiao-Ling He, Karen Richardson, et al. “The Mesenchymal Stem Cells in Multiple Sclerosis (MSCIMS) Trial Protocol and Baseline Cohort Characteristics: An Open-Label Pre-Test: Post-Test Study with Blinded Outcome Assessments.” *Trials* 12 (2011): 62. doi:10.1186/1745-6215-12-62.
- Consroe, P., K. Kennedy, and K. Schram. “Assay of Plasma Cannabidiol by Capillary Gas Chromatography/ion Trap Mass Spectroscopy Following High-Dose Repeated Daily Oral Administration in Humans.” *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 40, no. 3

- (November 1991): 517–22.
- Constantinescu, C. S., B. Hilliard, T. Fujioka, M. K. Bhopale, D. Calida, and A. M. Rostami. “Pathogenesis of Neuroimmunologic Diseases. Experimental Models.” *Immunologic Research* 17, no. 1–2 (1998): 217–27.
- Crawford, S. W., and F. B. Petersen. “Long-Term Survival from Respiratory Failure after Marrow Transplantation for Malignancy.” *The American Review of Respiratory Disease* 145, no. 3 (March 1992): 510–14. doi:10.1164/ajrccm/145.3.510.
- Crigler, Lauren, Rebecca C. Robey, Amy Asawachaicharn, Dina Gaupp, and Donald G. Phinney. “Human Mesenchymal Stem Cell Subpopulations Express a Variety of Neuro-Regulatory Molecules and Promote Neuronal Cell Survival and Neuritogenesis.” *Experimental Neurology* 198, no. 1 (March 2006): 54–64. doi:10.1016/j.expneurol.2005.10.029.
- Croxford, J. Ludovic, Gareth Pryce, Samuel J. Jackson, Catherine Ledent, Gavin Giovannoni, Roger G. Pertwee, Takashi Yamamura, and David Baker. “Cannabinoid-Mediated Neuroprotection, Not Immunosuppression, May Be More Relevant to Multiple Sclerosis.” *Journal of Neuroimmunology* 193, no. 1–2 (January 2008): 120–29. doi:10.1016/j.jneuroim.2007.10.024.
- Cunha, J. M., E. A. Carlini, A. E. Pereira, O. L. Ramos, C. Pimentel, R. Gagliardi, W. L. Sanvito, N. Lander, and R. Mechoulam. “Chronic Administration of Cannabidiol to Healthy Volunteers and Epileptic Patients.” *Pharmacology* 21, no. 3 (1980): 175–85.
- Dahlman, I., L. Jacobsson, A. Glaser, J. C. Lorentzen, M. Andersson, H. Luthman, and T. Olsson. “Genome-Wide Linkage Analysis of Chronic Relapsing Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Rat Identifies a Major Susceptibility Locus on Chromosome 9.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 162, no. 5 (March 1, 1999): 2581–88.
- Dal Canto, M. C., and H. L. Lipton. “Primary Demyelination in Theiler’s Virus Infection. An Ultrastructural Study.” *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 33, no. 6 (December 1975): 626–37.
- Dawson, V. L., and T. M. Dawson. “Nitric Oxide Neurotoxicity.” *Journal of Chemical Neuroanatomy* 10, no. 3–4 (June 1996): 179–90.
- De Lago, Eva, Javier Fernández-Ruiz, Silvia Ortega-Gutiérrez, Ana Cabranes, Gareth Pryce, David Baker, Mariluz López-Rodríguez, and José Antonio Ramos. “UCM707, an Inhibitor of the Anandamide Uptake, Behaves as a Symptom Control Agent in Models of Huntington’s Disease and Multiple Sclerosis, but Fails to Delay/arrest the Progression of Different Motor-Related Disorders.” *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 16, no. 1 (January 2006): 7–18. doi:10.1016/j.euroneuro.2005.06.001.
- De Lago, Eva, Alessia Ligresti, Giorgio Ortar, Enrico Morera, Ana Cabranes, Gareth Pryce, Maurizio Bifulco, David Baker, Javier Fernandez-Ruiz, and Vincenzo Di Marzo. “In Vivo Pharmacological Actions of Two Novel Inhibitors of Anandamide Cellular Uptake.” *European Journal of Pharmacology* 484, no. 2–3 (January 26, 2004): 249–57.
- De Miguel, M. P., S. Fuentes-Julián, A. Blázquez-Martínez, C. Y. Pascual, M. A. Aller, J. Arias, and F. Arnalich-Montiel. “Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stem Cells: Advances and Applications.” *Current Molecular Medicine* 12, no. 5 (June 2012): 574–91.
- De Oliveira, Gislane L. V., Kalil W. A. de Lima, Amanda M. Colombini, Daniel G. Pinheiro, Rodrigo A. Panepucci, Patrícia V. B. Palma, Doralina G. Brum, et al. “Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Isolated from Multiple Sclerosis Patients Have Distinct Gene Expression Profile and Decreased Suppressive Function Compared with Healthy Counterparts.” *Cell Transplantation* 24, no. 2 (2015): 151–65. doi:10.3727/096368913X675142.
- Dicker, Andrea, Katarina Le Blanc, Gaby Aström, Vanessa van Harmelen, Cecilia Götherström, Lennart Blomqvist, Peter Arner, and Mikael Rydén. “Functional Studies of Mesenchymal

- Stem Cells Derived from Adult Human Adipose Tissue.” *Experimental Cell Research* 308, no. 2 (August 15, 2005): 283–90. doi:10.1016/j.yexcr.2005.04.029.
- Di Marzo, Vincenzo, and Luciano De Petrocellis. “Why Do Cannabinoid Receptors Have More than One Endogenous Ligand?” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 367, no. 1607 (December 5, 2012): 3216–28. doi:10.1098/rstb.2011.0382.
- Di Nicola, Massimo, Carmelo Carlo-Stella, Michele Magni, Marco Milanesi, Paolo D. Longoni, Paola Matteucci, Salvatore Grisanti, and Alessandro M. Gianni. “Human Bone Marrow Stromal Cells Suppress T-Lymphocyte Proliferation Induced by Cellular or Nonspecific Mitogenic Stimuli.” *Blood* 99, no. 10 (May 15, 2002): 3838–43.
- Domingues, Helena S., Marsilius Mues, Hans Lassmann, Hartmut Wekerle, and Gurumoorthy Krishnamoorthy. “Functional and Pathogenic Differences of Th1 and Th17 Cells in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.” *PloS One* 5, no. 11 (2010): e15531. doi:10.1371/journal.pone.0015531.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, Fc Marini, Ds Krause, Rj Deans, A. Keating, Dj Prockop, and Em Horwitz. “Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement.” *Cytotherapy* 8, no. 4 (2006): 315–17. doi:10.1080/14653240600855905.
- Dore-Duffy, P., R. Washington, and L. Dragovic. “Expression of Endothelial Cell Activation Antigens in Microvessels from Patients with Multiple Sclerosis.” *Advances in Experimental Medicine and Biology* 331 (1993): 243–48.
- Elsohly, Mahmoud A., and Desmond Slade. “Chemical Constituents of Marijuana: The Complex Mixture of Natural Cannabinoids.” *Life Sciences* 78, no. 5 (December 22, 2005): 539–48. doi:10.1016/j.lfs.2005.09.011.
- Ferrero, Ivana, Letizia Mazzini, Deborah Rustichelli, Monica Gunetti, Katia Mareschi, Lucia Testa, Nicola Nasuelli, Gaia Donata Oggioni, and Franca Fagioli. “Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from Healthy Donors and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients.” *Cell Transplantation* 17, no. 3 (2008): 255–66.
- Figueroa, Fernando E., Flavio Carrión, Sandra Villanueva, and Maroun Khoury. “Mesenchymal Stem Cell Treatment for Autoimmune Diseases: A Critical Review.” *Biological Research* 45, no. 3 (2012): 269–77. doi:10.4067/S0716-97602012000300008.
- Filippini, Graziella, Luca Munari, Barbara Incorvaia, George C. Ebers, Chris Polman, Roberto D’Amico, and George P. A. Rice. “Interferons in Relapsing Remitting Multiple Sclerosis: A Systematic Review.” *Lancet (London, England)* 361, no. 9357 (February 15, 2003): 545–52. doi:10.1016/S0140-6736(03)12512-3.
- Freedman, Mark S., Amit Bar-Or, Harold L. Atkins, Dimitrios Karussis, Francesco Frassoni, Hillard Lazarus, Neil Scolding, et al. “The Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell Transplantation as a Treatment for Multiple Sclerosis: Consensus Report of the International MSCT Study Group.” *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 16, no. 4 (April 2010): 503–10. doi:10.1177/1352458509359727.
- Freedman, M. S., J. S. Wolinsky, B. Wamil, C. Confavreux, G. Comi, L. Kappos, T. P. Olsson, et al. “Teriflunomide Added to Interferon-B in Relapsing Multiple Sclerosis: A Randomized Phase II Trial.” *Neurology* 78, no. 23 (June 5, 2012): 1877–85. doi:10.1212/WNL.0b013e318258f7d4.
- Friedenstein, A. J., U. F. Deriglasova, N. N. Kulagina, A. F. Panasuk, S. F. Rudakowa, E. A. Luriá, and I. A. Ruadkow. “Precursors for Fibroblasts in Different Populations of Hematopoietic Cells as Detected by the in Vitro Colony Assay Method.” *Experimental Hematology* 2, no. 2 (1974): 83–92.
- Frohman, Elliot M., Michael K. Racke, and Cedric S. Raine. “Multiple Sclerosis--the Plaque and Its Pathogenesis.” *The New England Journal of Medicine* 354, no. 9 (March 2, 2006): 942–55.

doi:10.1056/NEJMra052130.

- Furlan, Roberto, Stefano Pluchino, and Gianvito Martino. "The Therapeutic Use of Gene Therapy in Inflammatory Demyelinating Diseases of the Central Nervous System." *Current Opinion in Neurology* 16, no. 3 (June 2003): 385–92. doi:10.1097/01.wco.0000073941.19076.0a.
- Galbraith, W., M. C. Wagner, J. Chao, M. Abaza, L. A. Ernst, M. A. Nederlof, R. J. Hartsock, D. L. Taylor, and A. S. Waggoner. "Imaging Cytometry by Multiparameter Fluorescence." *Cytometry* 12, no. 7 (1991): 579–96. doi:10.1002/cyto.990120702.
- Galiègue, S., S. Mary, J. Marchand, D. Dussossoy, D. Carrière, P. Carayon, M. Bouaboula, D. Shire, G. Le Fur, and P. Casellas. "Expression of Central and Peripheral Cannabinoid Receptors in Human Immune Tissues and Leukocyte Subpopulations." *European Journal of Biochemistry / FEBS* 232, no. 1 (August 15, 1995): 54–61.
- Galve-Roperh, Ismael, Valerio Chiurchiù, Javier Díaz-Alonso, Monica Bari, Manuel Guzmán, and Mauro Maccarrone. "Cannabinoid Receptor Signaling in Progenitor/stem Cell Proliferation and Differentiation." *Progress in Lipid Research* 52, no. 4 (October 2013): 633–50. doi:10.1016/j.plipres.2013.05.004.
- Gao, J., J. E. Dennis, R. F. Muzic, M. Lundberg, and A. I. Caplan. "The Dynamic in Vivo Distribution of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells after Infusion." *Cells, Tissues, Organs* 169, no. 1 (2001): 12–20. doi:47856.
- García-Merino, A., O. Fernández, X. Montalbán, C. de Andrés, C. Oreja-Guevara, A. Rodríguez-Antigüedad, T. Arbizu, and Grupo de Consenso de la Sociedad Española de Neurología. "Consensus Statement on Medication Use in Multiple Sclerosis by the Spanish Society of Neurology's Study Group for Demyelinating Diseases." *Neurología (Barcelona, Spain)* 28, no. 6 (August 2013): 375–78. doi:10.1016/j.nrl.2013.01.009.
- García-Sáinz, J. Adolfo, María Teresa Romero-Ávila, and Rocío Alcántara-Hernández. "Mechanisms Involved in $\alpha 1B$ -Adrenoceptor Desensitization." *IUBMB Life* 63, no. 10 (October 2011): 811–15. doi:10.1002/iub.519.
- Gardinier, M. V., P. Amiguet, C. Linington, and J. M. Matthieu. "Myelin/oligodendrocyte Glycoprotein Is a Unique Member of the Immunoglobulin Superfamily." *Journal of Neuroscience Research* 33, no. 1 (September 1992): 177–87. doi:10.1002/jnr.490330123.
- Gerdoni, Ezio, Barbara Gallo, Simona Casazza, Silvia Musio, Ivan Bonanni, Enrico Pedemonte, Renato Mantegazza, et al. "Mesenchymal Stem Cells Effectively Modulate Pathogenic Immune Response in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis." *Annals of Neurology* 61, no. 3 (March 2007): 219–27. doi:10.1002/ana.21076.
- Gharibi, Tohid, Majid Ahmadi, Narges Seyfizadeh, Farhad Jadidi-Niaragh, and Mehdi Yousefi. "Immunomodulatory Characteristics of Mesenchymal Stem Cells and Their Role in the Treatment of Multiple Sclerosis." *Cellular Immunology* 293, no. 2 (February 2015): 113–21. doi:10.1016/j.cellimm.2015.01.002.
- Gordon, David, Gordana Pavlovska, Colin P. Glover, James B. Uney, David Wraith, and Neil J. Scolding. "Human Mesenchymal Stem Cells Abrogate Experimental Allergic Encephalomyelitis after Intraperitoneal Injection, and with Sparse CNS Infiltration." *Neuroscience Letters* 448, no. 1 (December 19, 2008): 71–73. doi:10.1016/j.neulet.2008.10.040.
- Gordon, David, Gordana Pavlovska, James B. Uney, David C. Wraith, and Neil J. Scolding. "Human Mesenchymal Stem Cells Infiltrate the Spinal Cord, Reduce Demyelination, and Localize to White Matter Lesions in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 69, no. 11 (November 2010): 1087–95. doi:10.1097/NEN.0b013e3181f97392.
- Gran, B., B. Hemmer, M. Vergelli, H. F. McFarland, and R. Martin. "Molecular Mimicry and Multiple Sclerosis: Degenerate T-Cell Recognition and the Induction of Autoimmunity." *Annals of Neurology* 45, no. 5 (May 1999): 559–67.

- Grimsey, Natasha L., Catherine E. Goodfellow, Mike Dragunow, and Michelle Glass. "Cannabinoid Receptor 2 Undergoes Rab5-Mediated Internalization and Recycles via a Rab11-Dependent Pathway." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1813, no. 8 (August 2011): 1554–60. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.05.010.
- Gur-Wahnon, Devorah, Zipora Borovsky, Shaul Beyth, Meir Liebergall, and Jacob Rachmilewitz. "Contact-Dependent Induction of Regulatory Antigen-Presenting Cells by Human Mesenchymal Stem Cells Is Mediated via STAT3 Signaling." *Experimental Hematology* 35, no. 3 (March 2007): 426–33. doi:10.1016/j.exphem.2006.11.001.
- Gutierrez, Tannia, Jonathon D. Crystal, Alexander M. Zvonok, Alexandros Makriyannis, and Andrea G. Hohmann. "Self-Medication of a Cannabinoid CB2 Agonist in an Animal Model of Neuropathic Pain." *Pain* 152, no. 9 (September 2011): 1976–87. doi:10.1016/j.pain.2011.03.038.
- Haynesworth, S. E., J. Goshima, V. M. Goldberg, and A. I. Caplan. "Characterization of Cells with Osteogenic Potential from Human Marrow." *Bone* 13, no. 1 (1992): 81–88.
- Heneka, M. T., A. Sharp, P. Murphy, J. A. Lyons, L. Dumitrescu, and D. L. Feinstein. "The Heat Shock Response Reduces Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein-Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice." *Journal of Neurochemistry* 77, no. 2 (April 2001): 568–79.
- Hohlfeld, R. "Biotechnological Agents for the Immunotherapy of Multiple Sclerosis. Principles, Problems and Perspectives." *Brain: A Journal of Neurology* 120 (Pt 5) (May 1997): 865–916.
- Holz, A., B. Bielekova, R. Martin, and M. B. Oldstone. "Myelin-Associated Oligodendrocytic Basic Protein: Identification of an Encephalitogenic Epitope and Association with Multiple Sclerosis." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 164, no. 2 (January 15, 2000): 1103–9.
- Horwitz, E. M., K. Le Blanc, M. Dominici, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. C. Marini, R. J. Deans, D. S. Krause, A. Keating, and International Society for Cellular Therapy. "Clarification of the Nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy Position Statement." *Cytotherapy* 7, no. 5 (2005): 393–95. doi:10.1080/14653240500319234.
- Howlett, A. C. "Cannabinoid Receptor Signaling." *Handbook of Experimental Pharmacology*, no. 168 (2005): 53–79.
- Huang, Q. R., S. M. Teutsch, M. M. Buhler, B. H. Bennetts, R. N. Heard, N. Manolios, and G. J. Stewart. "Evaluation of the Apo-1/Fas Promoter Mva I Polymorphism in Multiple Sclerosis." *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 6, no. 1 (February 2000): 14–18.
- Huang, Y. M., M. Kouwenhoven, Y. P. Jin, R. Press, W. X. Huang, and H. Link. "Dendritic Cells Derived from Patients with Multiple Sclerosis Show High CD1a and Low CD86 Expression." *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 7, no. 2 (April 2001): 95–99.
- Hunter, Christopher A., and Rob Kastelein. "Interleukin-27: Balancing Protective and Pathological Immunity." *Immunity* 37, no. 6 (December 14, 2012): 960–69. doi:10.1016/j.immuni.2012.11.003.
- Izzo, Angelo A., Francesca Borrelli, Raffaele Capasso, Vincenzo Di Marzo, and Raphael Mechoulam. "Non-Psychotropic Plant Cannabinoids: New Therapeutic Opportunities from an Ancient Herb." *Trends in Pharmacological Sciences* 30, no. 10 (October 2009): 515–27. doi:10.1016/j.tips.2009.07.006.
- Jadidi-Niaragh, Farhad, and Abbas Mirshafiey. "Therapeutic Approach to Multiple Sclerosis by Novel Oral Drug." *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery* 5, no. 1 (January 2011): 66–80.
- Jean-Gilles, L., M. Braitch, M. L. Latif, J. Aram, A. J. Fahey, L. J. Edwards, R. A. Robins, et al. "Effects of pro-Inflammatory Cytokines on Cannabinoid CB1 and CB2 Receptors in Immune Cells." *Acta Physiologica (Oxford, England)* 214, no. 1 (May 2015): 63–74.

doi:10.1111/apha.12474.

- Jean-Gilles, L., S. Feng, C. R. Tench, V. Chapman, D. A. Kendall, D. A. Barrett, and C. S. Constantinescu. "Plasma Endocannabinoid Levels in Multiple Sclerosis." *Journal of the Neurological Sciences* 287, no. 1–2 (December 15, 2009): 212–15. doi:10.1016/j.jns.2009.07.021.
- Jiang, Shuxian, Meritxell Alberich-Jorda, Radoslaw Zagozdzon, Kalindi Parmar, Yigong Fu, Peter Mauch, Naheed Banu, et al. "Cannabinoid Receptor 2 and Its Agonists Mediate Hematopoiesis and Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Mobilization." *Blood* 117, no. 3 (January 20, 2011): 827–38. doi:10.1182/blood-2010-01-265082.
- Jiang, Shuxian, Yigong Fu, and Hava Karsenty Avraham. "Regulation of Hematopoietic Stem Cell Trafficking and Mobilization by the Endocannabinoid System." *Transfusion* 51 Suppl 4 (November 2011): 65S – 71S. doi:10.1111/j.1537-2995.2011.03368.x.
- Jiang, Shuxian, Yigong Fu, John Williams, Jodianne Wood, Lakshmiopathi Pandarinathan, Shiri Avraham, Alexandros Makriyannis, Shalom Avraham, and Hava Karsenty Avraham. "Expression and Function of Cannabinoid Receptors CB1 and CB2 and Their Cognate Cannabinoid Ligands in Murine Embryonic Stem Cells." *PloS One* 2, no. 7 (2007): e641. doi:10.1371/journal.pone.0000641.
- Jiang, Xun, Pengcheng Cui, Wenxian Chen, Daqing Zhao, Jiasheng Luo, Guize Li, and An Sun. "[Study on the directed inducing process of cartilage cells differentiated from human marrow mesenchymal stem cells]." *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 37, no. 2 (April 2002): 137–39.
- Johnson, K. P. "Management of Relapsing/remitting Multiple Sclerosis with Copolymer 1 (Copaxone)." *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 1, no. 6 (July 1996): 325–26.
- Jordt, Sven-Eric, Diana M. Bautista, Huai-Hu Chuang, David D. McKemy, Peter M. Zygmunt, Edward D. Högestätt, Ian D. Meng, and David Julius. "Mustard Oils and Cannabinoids Excite Sensory Nerve Fibres through the TRP Channel ANKTM1." *Nature* 427, no. 6971 (January 15, 2004): 260–65. doi:10.1038/nature02282.
- Kabat, E. A., A. Wolf, and A. E. Bezer. "THE RAPID PRODUCTION OF ACUTE DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS IN RHESUS MONKEYS BY INJECTION OF HETEROLOGOUS AND HOMOLOGOUS BRAIN TISSUE WITH ADJUVANTS." *The Journal of Experimental Medicine* 85, no. 1 (January 1, 1947): 117–30.
- Karussis, Dimitrios, Savas Grigoriadis, Eleni Polyzoidou, Nikolaos Grigoriadis, Shimon Slavin, and Oded Abramsky. "Neuroprotection in Multiple Sclerosis." *Clinical Neurology and Neurosurgery* 108, no. 3 (March 2006): 250–54. doi:10.1016/j.clineuro.2005.11.007.
- Karussis, Dimitrios, Clementine Karageorgiou, Adi Vaknin-Dembinsky, Basan Gowda-Kurkalli, John M. Gormi, Ibrahim Kassis, Jeff W. M. Bulte, et al. "Safety and Immunological Effects of Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Patients with Multiple Sclerosis and Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Archives of Neurology* 67, no. 10 (October 2010): 1187–94. doi:10.1001/archneurol.2010.248.
- Kassis, Ibrahim, Nikolaos Grigoriadis, Basan Gowda-Kurkalli, Rachel Mizrahi-Kol, Tamir Ben-Hur, Shimon Slavin, Oded Abramsky, and Dimitrios Karussis. "Neuroprotection and Immunomodulation with Mesenchymal Stem Cells in Chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis." *Archives of Neurology* 65, no. 6 (June 2008): 753–61. doi:10.1001/archneur.65.6.753.
- Kastrinaki, M.-C., P. Sidiropoulos, S. Roche, J. Ringe, S. Lehmann, H. Kritikos, V.-M. Vlahava, et al. "Functional, Molecular and Proteomic Characterisation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Rheumatoid Arthritis." *Annals of the Rheumatic Diseases* 67, no. 6 (June 2008): 741–49. doi:10.1136/ard.2007.076174.
- Kawanabe, Noriaki, Satoko Murata, Kaoru Murakami, Yoshihito Ishihara, Satoru Hayano, Hiroshi

- Kurosaka, Hiroshi Kamioka, Teruko Takano-Yamamoto, and Takashi Yamashiro. "Isolation of Multipotent Stem Cells in Human Periodontal Ligament Using Stage-Specific Embryonic Antigen-4." *Differentiation; Research in Biological Diversity* 79, no. 2 (February 2010): 74–83. doi:10.1016/j.diff.2009.10.005.
- Keating, Armand. "Mesenchymal Stromal Cells: New Directions." *Cell Stem Cell* 10, no. 6 (June 14, 2012): 709–16. doi:10.1016/j.stem.2012.05.015.
- Kim, Dong Hyun, Keon Hee Yoo, Kyung Suk Choi, Jaewon Choi, Sang-Yun Choi, Sung-Eun Yang, Yoon-Sun Yang, et al. "Gene Expression Profile of Cytokine and Growth Factor during Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell." *Cytokine* 31, no. 2 (July 21, 2005): 119–26. doi:10.1016/j.cyto.2005.04.004.
- Klein, Thomas W. "Cannabinoid-Based Drugs as Anti-Inflammatory Therapeutics." *Nature Reviews. Immunology* 5, no. 5 (May 2005): 400–411. doi:10.1038/nri1602.
- Kojima, K., T. Berger, H. Lassmann, D. Hinze-Selch, Y. Zhang, J. Gehrmann, K. Reske, H. Wekerle, and C. Linington. "Experimental Autoimmune Panencephalitis and Uveoretinitis Transferred to the Lewis Rat by T Lymphocytes Specific for the S100 Beta Molecule, a Calcium Binding Protein of Astroglia." *The Journal of Experimental Medicine* 180, no. 3 (September 1, 1994): 817–29.
- Kozela, Ewa, Nirit Lev, Nathali Kaushansky, Raya Eilam, Neta Rimmerman, Rivka Levy, Avraham Ben-Nun, Ana Juknat, and Zvi Vogel. "Cannabidiol Inhibits Pathogenic T Cells, Decreases Spinal Microglial Activation and Ameliorates Multiple Sclerosis-like Disease in C57BL/6 Mice." *British Journal of Pharmacology* 163, no. 7 (August 2011): 1507–19. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01379.x.
- Krampera, M. "Mesenchymal Stromal Cell 'Licensing': A Multistep Process." *Leukemia* 25, no. 9 (September 2011): 1408–14. doi:10.1038/leu.2011.108.
- Krampera, Mauro, Massimo Franchini, Giovanni Pizzolo, and Giuseppe Aprili. "Mesenchymal Stem Cells: From Biology to Clinical Use." *Blood Transfusion = Trasfusione Del Sangue* 5, no. 3 (July 2007): 120–29. doi:10.2450/2007.0029-07.
- Krampera, Mauro, Sarah Glennie, Julian Dyson, Diane Scott, Ruthline Laylor, Elizabeth Simpson, and Francesco Dazzi. "Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Response of Naive and Memory Antigen-Specific T Cells to Their Cognate Peptide." *Blood* 101, no. 9 (May 1, 2003): 3722–29. doi:10.1182/blood-2002-07-2104.
- Kuhlmann, Tanja, Gueanelle Lingfeld, Andreas Bitsch, Jana Schuchardt, and Wolfgang Brück. "Acute Axonal Damage in Multiple Sclerosis Is Most Extensive in Early Disease Stages and Decreases over Time." *Brain: A Journal of Neurology* 125, no. Pt 10 (October 2002): 2202–12.
- Kurte, Mónica, Javiera Bravo-Alegría, Alexander Torres, Vania Carrasco, Cristina Ibáñez, Ana María Vega-Letter, Catalina Fernández-O’Ryan, et al. "Intravenous Administration of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Induces a Switch from Classical to Atypical Symptoms in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis." *Stem Cells International* 2015 (2015): 140170. doi:10.1155/2015/140170.
- Lafaille, J. J., F. V. Keere, A. L. Hsu, J. L. Baron, W. Haas, C. S. Raine, and S. Tonegawa. "Myelin Basic Protein-Specific T Helper 2 (Th2) Cells Cause Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Immunodeficient Hosts rather than Protect Them from the Disease." *The Journal of Experimental Medicine* 186, no. 2 (July 21, 1997): 307–12.
- Lai, C. F., J. Ripberger, K. K. Morella, J. Jurlander, T. S. Hawley, W. E. Carson, T. Kordula, et al. "Receptors for Interleukin (IL)-10 and IL-6-Type Cytokines Use Similar Signaling Mechanisms for Inducing Transcription through IL-6 Response Elements." *The Journal of Biological Chemistry* 271, no. 24 (June 14, 1996): 13968–75.
- Lanz, Tobias V., Christiane A. Opitz, Peggy P. Ho, Ankur Agrawal, Christian Lutz, Michael Weller, Andrew L. Mellor, Lawrence Steinman, Wolfgang Wick, and Michael Platten. "Mouse

- Mesenchymal Stem Cells Suppress Antigen-Specific TH Cell Immunity Independent of Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 (IDO1).” *Stem Cells and Development* 19, no. 5 (May 2010): 657–68. doi:10.1089/scd.2009.0385.
- Larghero, J., D. Farge, A. Braccini, S. Lecourt, A. Scherberich, E. Foïs, F. Verrecchia, et al. “Phenotypical and Functional Characteristics of in Vitro Expanded Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from Patients with Systemic Sclerosis.” *Annals of the Rheumatic Diseases* 67, no. 4 (April 2008): 443–49. doi:10.1136/ard.2007.071233.
- Lassmann, H., K. Kitz, and H. M. Wisniewski. “Structural Variability of Demyelinating Lesions in Different Models of Subacute and Chronic Experimental Allergic Encephalomyelitis.” *Acta Neuropathologica* 51, no. 3 (1980): 191–201.
- Lassmann, H., and H. M. Wisniewski. “Chronic Relapsing Experimental Allergic Encephalomyelitis: Clinicopathological Comparison with Multiple Sclerosis.” *Archives of Neurology* 36, no. 8 (August 1979): 490–97.
- Lauckner, Jane E., Jill B. Jensen, Huei-Ying Chen, Hui-Chen Lu, Bertil Hille, and Ken Mackie. “GPR55 Is a Cannabinoid Receptor That Increases Intracellular Calcium and Inhibits M Current.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, no. 7 (February 19, 2008): 2699–2704. doi:10.1073/pnas.0711278105.
- Le Blanc, Katarina, and Dimitrios Moutziakakos. “Multipotent Mesenchymal Stromal Cells and the Innate Immune System.” *Nature Reviews. Immunology* 12, no. 5 (May 2012): 383–96. doi:10.1038/nri3209.
- Lenz, D. C., N. A. Wolf, and R. H. Swanborg. “Strain Variation in Autoimmunity: Attempted Tolerization of DA Rats Results in the Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 163, no. 4 (August 15, 1999): 1763–68.
- Leterrier, Christophe, Damien Bonnard, Damien Carrel, Jean Rossier, and Zsolt Lenkei. “Constitutive Endocytic Cycle of the CB1 Cannabinoid Receptor.” *The Journal of Biological Chemistry* 279, no. 34 (August 20, 2004): 36013–21. doi:10.1074/jbc.M403990200.
- Levi, Benjamin, Aaron W. James, Emily R. Nelson, Shuli Li, Michelle Peng, George W. Commons, Min Lee, Benjamin Wu, and Michael T. Longaker. “Human Adipose-Derived Stromal Cells Stimulate Autogenous Skeletal Repair via Paracrine Hedgehog Signaling with Calvarial Osteoblasts.” *Stem Cells and Development* 20, no. 2 (February 2011): 243–57. doi:10.1089/scd.2010.0250.
- Levi, Benjamin, Aaron W. James, Derrick C. Wan, Jason P. Glotzbach, George W. Commons, and Michael T. Longaker. “Regulation of Human Adipose-Derived Stromal Cell Osteogenic Differentiation by Insulin-like Growth Factor-1 and Platelet-Derived Growth Factor-Alpha.” *Plastic and Reconstructive Surgery* 126, no. 1 (July 2010): 41–52. doi:10.1097/PRS.0b013e3181da8858.
- Li, Jing, Helen K. W. Law, Yu Lung Lau, and Godfrey Chi Fung Chan. “Differential Damage and Recovery of Human Mesenchymal Stem Cells after Exposure to Chemotherapeutic Agents.” *British Journal of Haematology* 127, no. 3 (November 2004): 326–34. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.05200.x.
- Linington, C., and H. Lassmann. “Antibody Responses in Chronic Relapsing Experimental Allergic Encephalomyelitis: Correlation of Serum Demyelinating Activity with Antibody Titre to the Myelin/oligodendrocyte Glycoprotein (MOG).” *Journal of Neuroimmunology* 17, no. 1 (December 1987): 61–69.
- Lou, Zhi-Yin, Chan Chen, Qing He, Chong-Bo Zhao, and Bao-Guo Xiao. “Targeting CB(2) Receptor as a Neuroinflammatory Modulator in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.” *Molecular Immunology* 49, no. 3 (December 2011): 453–61. doi:10.1016/j.molimm.2011.09.016.
- Lou, Zhi-Yin, Chong-Bo Zhao, and Bao-Guo Xiao. “Immunoregulation of Experimental

- Autoimmune Encephalomyelitis by the Selective CB1 Receptor Antagonist.” *Journal of Neuroscience Research* 90, no. 1 (January 2012): 84–95. doi:10.1002/jnr.22721.
- . “Immunoregulation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by the Selective CB1 Receptor Antagonist.” *Journal of Neuroscience Research* 90, no. 1 (January 2012): 84–95. doi:10.1002/jnr.22721.
- Lublin, F. D., and S. C. Reingold. “Defining the Clinical Course of Multiple Sclerosis: Results of an International Survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis.” *Neurology* 46, no. 4 (April 1996): 907–11.
- Lublin, Fred D. “New Multiple Sclerosis Phenotypic Classification.” *European Neurology* 72 Suppl 1 (2014): 1–5. doi:10.1159/000367614.
- Luongo, L., E. Palazzo, S. Tambaro, C. Giordano, L. Gatta, M. A. Scafuro, F. Sca Rossi, et al. “1-(2’,4’-Dichlorophenyl)-6-Methyl-N-Cyclohexylamine-1,4-dihydroindeno[1,2-C]pyrazole-3-Carboxamide, a Novel CB2 Agonist, Alleviates Neuropathic Pain through Functional Microglial Changes in Mice.” *Neurobiology of Disease* 37, no. 1 (January 2010): 177–85. doi:10.1016/j.nbd.2009.09.021.
- Luz-Crawford, Patricia, Monica Kurte, Javiera Bravo-Alegría, Rafael Contreras, Estefania Nova-Lamperti, Gautier Tejedor, Danièle Noël, et al. “Mesenchymal Stem Cells Generate a CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cell Population during the Differentiation Process of Th1 and Th17 Cells.” *Stem Cell Research & Therapy* 4, no. 3 (2013): 65. doi:10.1186/scrt216.
- Lyman, W. D., J. R. Sonett, C. F. Brosnan, R. Elkin, and M. B. Bornstein. “Delta 9-Tetrahydrocannabinol: A Novel Treatment for Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.” *Journal of Neuroimmunology* 23, no. 1 (June 1989): 73–81.
- Maccarrone, M. “Good News for CB1 Receptors: Endogenous Agonists Are in the Right Place.” *British Journal of Pharmacology* 153, no. 2 (January 2008): 179–81. doi:10.1038/sj.bjp.0707566.
- Majumdar, M. K., M. A. Thiede, S. E. Haynesworth, S. P. Bruder, and S. L. Gerson. “Human Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Express Hematopoietic Cytokines and Support Long-Term Hematopoiesis When Differentiated toward Stromal and Osteogenic Lineages.” *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 9, no. 6 (December 2000): 841–48. doi:10.1089/152581600750062264.
- Mallam, Elizabeth, Kevin Kemp, Alastair Wilkins, Claire Rice, and Neil Scolding. “Characterization of in Vitro Expanded Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells from Patients with Multiple Sclerosis.” *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 16, no. 8 (August 2010): 909–18. doi:10.1177/1352458510371959.
- Maresz, Katarzyna, Erica J. Carrier, Eugene D. Ponomarev, Cecilia J. Hillard, and Bonnie N. Dittel. “Modulation of the Cannabinoid CB2 Receptor in Microglial Cells in Response to Inflammatory Stimuli.” *Journal of Neurochemistry* 95, no. 2 (October 2005): 437–45. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03380.x.
- Maresz, Katarzyna, Gareth Pryce, Eugene D. Ponomarev, Giovanni Marsicano, J. Ludovic Croxford, Leah P. Shriver, Catherine Ledent, et al. “Direct Suppression of CNS Autoimmune Inflammation via the Cannabinoid Receptor CB1 on Neurons and CB2 on Autoreactive T Cells.” *Nature Medicine* 13, no. 4 (April 2007): 492–97. doi:10.1038/nm1561.
- Mason, D., I. MacPhee, and F. Antoni. “The Role of the Neuroendocrine System in Determining Genetic Susceptibility to Experimental Allergic Encephalomyelitis in the Rat.” *Immunology* 70, no. 1 (May 1990): 1–5.
- Matsuda, L. A., T. I. Bonner, and S. J. Lolait. “Cannabinoid Receptors: Which Cells, Where, How, and Why?” *NIDA Research Monograph* 126 (1992): 48–56.
- Mayani, Héctor. “A Glance into Somatic Stem Cell Biology: Basic Principles, New Concepts, and Clinical Relevance.” *Archives of Medical Research* 34, no. 1 (February 2003): 3–15.

- Mazzanti, Benedetta, Alessandra Aldinucci, Tiziana Biagioli, Alessandro Barilaro, Serena Urbani, Simone Dal Pozzo, Maria Pia Amato, et al. "Differences in Mesenchymal Stem Cell Cytokine Profiles between MS Patients and Healthy Donors: Implication for Assessment of Disease Activity and Treatment." *Journal of Neuroimmunology* 199, no. 1–2 (August 13, 2008): 142–50. doi:10.1016/j.jneuroim.2008.05.006.
- Mechoulam, Raphael, Linda A. Parker, and Ruth Gallily. "Cannabidiol: An Overview of Some Pharmacological Aspects." *Journal of Clinical Pharmacology* 42, no. 11 Suppl (November 2002): 11S – 19S.
- Mechoulam, Raphael, Maximilian Peters, Eric Murillo-Rodriguez, and Lumír O. Hanus. "Cannabidiol--Recent Advances." *Chemistry & Biodiversity* 4, no. 8 (August 2007): 1678–92. doi:10.1002/cbdv.200790147.
- Mendel, I., N. Kerlero de Rosbo, and A. Ben-Nun. "A Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Peptide Induces Typical Chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in H-2b Mice: Fine Specificity and T Cell Receptor V Beta Expression of Encephalitogenic T Cells." *European Journal of Immunology* 25, no. 7 (July 1995): 1951–59. doi:10.1002/eji.1830250723.
- Miller, D. M., B. Weinstock-Guttman, F. Béthoux, J. C. Lee, G. Beck, V. Block, L. Durelli, et al. "A Meta-Analysis of Methylprednisolone in Recovery from Multiple Sclerosis Exacerbations." *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 6, no. 4 (August 2000): 267–73.
- Mohajeri, Maryam, Ali Farazmand, Mandana Mohyeddin Bonab, Behrooz Nikbin, and Alireza Minagar. "FOXP3 Gene Expression in Multiple Sclerosis Patients Pre- and Post Mesenchymal Stem Cell Therapy." *Iranian Journal of Allergy, Asthma, and Immunology* 10, no. 3 (September 2011): 155–61. doi:10.1007/ijaa.155161.
- Mohyeddin Bonab, Mandana, Sepideh Yazdanbakhsh, Jamshid Lotfi, Kamran Alimoghaddom, Fatemeh Talebian, Farnaz Hooshmand, Ardeshtir Ghavamzadeh, and Behrouz Nikbin. "Does Mesenchymal Stem Cell Therapy Help Multiple Sclerosis Patients? Report of a Pilot Study." *Iranian Journal of Immunology: IJI* 4, no. 1 (March 2007): 50–57. doi:10.1007/ijaa.155161.
- Morando, Sara, Tiziana Vigo, Marianna Esposito, Simona Casazza, Giovanni Novi, Maria Cristina Principato, Roberto Furlan, and Antonio Uccelli. "The Therapeutic Effect of Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Is Mediated by Peripheral and Central Mechanisms." *Stem Cell Research & Therapy* 3, no. 1 (2012): 3. doi:10.1186/scrt94.
- Morris-Downes, Margaret M., Kirsty McCormack, David Baker, Dinesh Sivaprasad, Janahan Natkunarajah, and Sandra Amor. "Encephalitogenic and Immunogenic Potential of Myelin-Associated Glycoprotein (MAG), Oligodendrocyte-Specific Glycoprotein (OSP) and 2',3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase (CNPase) in ABH and SJL Mice." *Journal of Neuroimmunology* 122, no. 1–2 (January 2002): 20–33.
- Munger, K. L., S. M. Zhang, E. O'Reilly, M. A. Hernán, M. J. Olek, W. C. Willett, and A. Ascherio. "Vitamin D Intake and Incidence of Multiple Sclerosis." *Neurology* 62, no. 1 (January 13, 2004): 60–65.
- Munro, S., K. L. Thomas, and M. Abu-Shaar. "Molecular Characterization of a Peripheral Receptor for Cannabinoids." *Nature* 365, no. 6441 (September 2, 1993): 61–65. doi:10.1038/365061a0.
- Newman, Robert E., Dana Yoo, Michelle A. LeRoux, and Alla Danilkovitch-Miagkova. "Treatment of Inflammatory Diseases with Mesenchymal Stem Cells." *Inflammation & Allergy Drug Targets* 8, no. 2 (June 2009): 110–23.
- Nie, Y., Cs Lau, Akw Lie, Gcf Chan, and My Mok. "Defective Phenotype of Mesenchymal Stem Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus." *Lupus* 19, no. 7 (June 2010): 850–59. doi:10.1177/0961203309361482.
- Noseworthy, J. H., C. Lucchinetti, M. Rodriguez, and B. G. Weinshenker. "Multiple Sclerosis." *The New England Journal of Medicine* 343, no. 13 (September 28, 2000): 938–52.

doi:10.1056/NEJM200009283431307.

- Novak, John C., Amy E. Lovett-Racke, and Michael K. Racke. "Monoclonal Antibody Therapies and Neurologic Disorders." *Archives of Neurology* 65, no. 9 (September 2008): 1162–65. doi:10.1001/archneur.65.9.1162.
- Offertáler, László, Fong-Ming Mo, Sándor Bátakai, Jie Liu, Malcolm Begg, Raj K. Razdan, Billy R. Martin, Richard D. Bukoski, and George Kunos. "Selective Ligands and Cellular Effectors of a G Protein-Coupled Endothelial Cannabinoid Receptor." *Molecular Pharmacology* 63, no. 3 (March 2003): 699–705.
- Owen, M., and A. J. Friedenstein. "Stromal Stem Cells: Marrow-Derived Osteogenic Precursors." *Ciba Foundation Symposium* 136 (1988): 42–60.
- Palazuelos, Javier, Tania Aguado, M. Ruth Pazos, Boris Julien, Carolina Carrasco, Eva Resel, Onintza Sagredo, et al. "Microglial CB2 Cannabinoid Receptors Are Neuroprotective in Huntington's Disease Excitotoxicity." *Brain: A Journal of Neurology* 132, no. Pt 11 (November 2009): 3152–64. doi:10.1093/brain/awp239.
- Palazuelos, Javier, Nathalie Davoust, Boris Julien, Eric Hatterer, Tania Aguado, Raphael Mechoulam, Cristina Benito, et al. "The CB(2) Cannabinoid Receptor Controls Myeloid Progenitor Trafficking: Involvement in the Pathogenesis of an Animal Model of Multiple Sclerosis." *The Journal of Biological Chemistry* 283, no. 19 (May 9, 2008): 13320–29. doi:10.1074/jbc.M707960200.
- Pandey, Rupal, Venkatesh L. Hegde, Narendra P. Singh, Lorne Hofseth, Uday Singh, Swapan Ray, Mitzi Nagarkatti, and Prakash S. Nagarkatti. "Use of Cannabinoids as a Novel Therapeutic Modality against Autoimmune Hepatitis." *Vitamins and Hormones* 81 (2009): 487–504. doi:10.1016/S0083-6729(09)81019-4.
- Papadaki, H. A., F. M. Gibson, M. Psyllaki, E. C. Gordon-Smith, J. C. Marsh, and G. D. Eliopoulos. "Assessment of Bone Marrow Stem Cell Reserve and Function and Stromal Cell Function in Patients with Severe Congenital Neutropenia." *European Journal of Haematology* 67, no. 4 (October 2001): 245–51.
- Papadaki, H. A., M. Tsagournisakis, V. Mastorodemos, C. Pontikoglou, A. Damianaki, K. Pyrovolaki, K. Stamatopoulos, A. Fassas, A. Plaitakis, and G. D. Eliopoulos. "Normal Bone Marrow Hematopoietic Stem Cell Reserves and Normal Stromal Cell Function Support the Use of Autologous Stem Cell Transplantation in Patients with Multiple Sclerosis." *Bone Marrow Transplantation* 36, no. 12 (December 2005): 1053–63. doi:10.1038/sj.bmt.1705179.
- Papadaki, Helen A., Heraklis D. Kritikos, Claudia Gemetzi, Helen Koutala, Judith C. W. Marsh, Dimitrios T. Boumpas, and George D. Eliopoulos. "Bone Marrow Progenitor Cell Reserve and Function and Stromal Cell Function Are Defective in Rheumatoid Arthritis: Evidence for a Tumor Necrosis Factor Alpha-Mediated Effect." *Blood* 99, no. 5 (March 1, 2002): 1610–19.
- Papadaki, Helen A., Judith C. W. Marsh, and George D. Eliopoulos. "Bone Marrow Stem Cells and Stromal Cells in Autoimmune Cytopenias." *Leukemia & Lymphoma* 43, no. 4 (April 2002): 753–60. doi:10.1080/10428190290016854.
- Parr, Ann M., Iris Kulbatski, and Charles H. Tator. "Transplantation of Adult Rat Spinal Cord Stem/progenitor Cells for Spinal Cord Injury." *Journal of Neurotrauma* 24, no. 5 (May 2007): 835–45. doi:10.1089/neu.2006.3771.
- Paterson, P. Y. "Experimental Allergic Encephalomyelitis: Role of Fibrin Deposition in Immunopathogenesis of Inflammation in Rats." *Federation Proceedings* 35, no. 13 (November 1976): 2428–34.
- . "Transfer of Allergic Encephalomyelitis in Rats by Means of Lymph Node Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 111 (January 1, 1960): 119–36.
- Payne, Natalie L., Guizhi Sun, Courtney McDonald, Daniel Layton, Leon Moussa, Ashley Emerson-Webber, Nadege Veron, et al. "Distinct Immunomodulatory and Migratory Mechanisms Underpin the Therapeutic Potential of Human Mesenchymal Stem Cells in Autoimmune

- Demyelination.” *Cell Transplantation* 22, no. 8 (2013): 1409–25.
doi:10.3727/096368912X657620.
- Payne, Natalie, Christopher Siatskas, Adele Barnard, and Claude C. A. Bernard. “The Prospect of Stem Cells as Multi-Faceted Purveyors of Immune Modulation, Repair and Regeneration in Multiple Sclerosis.” *Current Stem Cell Research & Therapy* 6, no. 1 (March 2011): 50–62.
- Pender, M. P. “Demyelination and Neurological Signs in Experimental Allergic Encephalomyelitis.” *Journal of Neuroimmunology* 15, no. 1 (May 1987): 11–24.
- Pender, M. P., Z. Tabi, K. B. Nguyen, and P. A. McCombe. “The Proximal Peripheral Nervous System Is a Major Site of Demyelination in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Induced in the Lewis Rat by a Myelin Basic Protein-Specific T Cell Clone.” *Acta Neuropathologica* 89, no. 6 (1995): 527–31.
- Perras C, null. “Sativex for the Management of Multiple Sclerosis Symptoms.” *Issues in Emerging Health Technologies*, no. 72 (September 2005): 1–4.
- Pertwee, R. G., A. C. Howlett, M. E. Abood, S. P. H. Alexander, V. Di Marzo, M. R. Elphick, P. J. Greasley, et al. “International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid Receptors and Their Ligands: Beyond CB₁ and CB₂.” *Pharmacological Reviews* 62, no. 4 (December 2010): 588–631. doi:10.1124/pr.110.003004.
- Pertwee, R. G., and R. A. Ross. “Cannabinoid Receptors and Their Ligands.” *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids* 66, no. 2–3 (March 2002): 101–21.
doi:10.1054/plef.2001.0341.
- Pertwee, Roger G. “Cannabinoids and Multiple Sclerosis.” *Pharmacology & Therapeutics* 95, no. 2 (August 2002): 165–74.
- . “Targeting the Endocannabinoid System with Cannabinoid Receptor Agonists: Pharmacological Strategies and Therapeutic Possibilities.” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 367, no. 1607 (December 5, 2012): 3353–63. doi:10.1098/rstb.2011.0381.
- Peterson, E. W., C. C. Cho, and M. L. Finlayson. “Fear of Falling and Associated Activity Curtailment among Middle Aged and Older Adults with Multiple Sclerosis.” *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 13, no. 9 (November 2007): 1168–75.
doi:10.1177/1352458507079260.
- Pistoia, Vito, and Lizzia Raffaghello. “Potential of Mesenchymal Stem Cells for the Therapy of Autoimmune Diseases.” *Expert Review of Clinical Immunology* 6, no. 2 (March 2010): 211–18.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, and D. R. Marshak. “Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells.” *Science (New York, N.Y.)* 284, no. 5411 (April 2, 1999): 143–47.
- Pluchino, Stefano, Angelo Quattrini, Elena Brambilla, Angela Gritti, Giuliana Salani, Giorgia Dina, Rossella Galli, et al. “Injection of Adult Neurospheres Induces Recovery in a Chronic Model of Multiple Sclerosis.” *Nature* 422, no. 6933 (April 17, 2003): 688–94.
doi:10.1038/nature01552.
- Polman, C. H., C. D. Dijkstra, T. Sminia, and J. C. Koetsier. “Immunohistological Analysis of Macrophages in the Central Nervous System of Lewis Rats with Acute Experimental Allergic Encephalomyelitis.” *Journal of Neuroimmunology* 11, no. 3 (May 1986): 215–22.
- Polman, C. H., I. Matthaei, C. J. de Groot, J. C. Koetsier, T. Sminia, and C. D. Dijkstra. “Low-Dose Cyclosporin A Induces Relapsing Remitting Experimental Allergic Encephalomyelitis in the Lewis Rat.” *Journal of Neuroimmunology* 17, no. 3 (February 1988): 209–16.
- Praksova, Petra, Pavel Stourac, Josef Bednarik, Eva Vlckova, Zuzana Mikulkova, and Jaroslav Michalek. “Immunoregulatory T Cells in Multiple Sclerosis and the Effect of Interferon Beta and Glatiramer Acetate Treatment on T Cell Subpopulations.” *Journal of the Neurological*

- Sciences* 319, no. 1–2 (August 15, 2012): 18–23. doi:10.1016/j.jns.2012.05.036.
- Prasanna, S. Jyothi, Divya Gopalakrishnan, Shilpa Rani Shankar, and Anoop Babu Vasandan. “Pro-Inflammatory Cytokines, IFN γ and TNF α , Influence Immune Properties of Human Bone Marrow and Wharton Jelly Mesenchymal Stem Cells Differentially.” *PloS One* 5, no. 2 (2010): e9016. doi:10.1371/journal.pone.0009016.
- Prockop, Darwin J., and Joo Youn Oh. “Mesenchymal Stem/stromal Cells (MSCs): Role as Guardians of Inflammation.” *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 20, no. 1 (January 2012): 14–20. doi:10.1038/mt.2011.211.
- Pryce, Gareth, Zubair Ahmed, Deborah J. R. Hankey, Samuel J. Jackson, J. Ludovic Croxford, Jennifer M. Pocock, Catherine Ledent, et al. “Cannabinoids Inhibit Neurodegeneration in Models of Multiple Sclerosis.” *Brain: A Journal of Neurology* 126, no. Pt 10 (October 2003): 2191–2202. doi:10.1093/brain/awg224.
- Pryce, G., and D. Baker. “Control of Spasticity in a Multiple Sclerosis Model Is Mediated by CB1, Not CB2, Cannabinoid Receptors.” *British Journal of Pharmacology* 150, no. 4 (February 2007): 519–25. doi:10.1038/sj.bjp.0707003.
- Racke, Michael K., and Amy E. Lovett-Racke. “Glatiramer Acetate Treatment of Multiple Sclerosis: An Immunological Perspective.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186, no. 4 (February 15, 2011): 1887–90. doi:10.4049/jimmunol.1090138.
- Rafei, Moutih, Elena Birman, Kathy Forner, and Jacques Galipeau. “Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.” *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 17, no. 10 (October 2009): 1799–1803. doi:10.1038/mt.2009.157.
- Rafei, Moutih, Philippe M. Campeau, Adriana Aguilar-Mahecha, Marguerite Buchanan, Patrick Williams, Elena Birman, Shala Yuan, et al. “Mesenchymal Stromal Cells Ameliorate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Inhibiting CD4 Th17 T Cells in a CC Chemokine Ligand 2-Dependent Manner.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182, no. 10 (May 15, 2009): 5994–6002. doi:10.4049/jimmunol.0803962.
- Raine, C. S., B. Cannella, S. L. Hauser, and C. P. Genain. “Demyelination in Primate Autoimmune Encephalomyelitis and Acute Multiple Sclerosis Lesions: A Case for Antigen-Specific Antibody Mediation.” *Annals of Neurology* 46, no. 2 (August 1999): 144–60.
- Raine, C. S., and A. H. Cross. “Axonal Dystrophy as a Consequence of Long-Term Demyelination.” *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 60, no. 5 (May 1989): 714–25.
- Raine, C. S., and U. Traugott. “Experimental Autoimmune Demyelination. Chronic Relapsing Models and Their Therapeutic Implications for Multiple Sclerosis.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 436 (1984): 33–51.
- Ramírez, Belén G., Cristina Blázquez, Teresa Gómez del Pulgar, Manuel Guzmán, and María L. de Ceballos. “Prevention of Alzheimer’s Disease Pathology by Cannabinoids: Neuroprotection Mediated by Blockade of Microglial Activation.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25, no. 8 (February 23, 2005): 1904–13. doi:10.1523/JNEUROSCI.4540-04.2005.
- Ramirez, Servio H., János Haskó, Andrew Skuba, Shongshan Fan, Holly Dykstra, Ryan McCormick, Nancy Reichenbach, et al. “Activation of Cannabinoid Receptor 2 Attenuates Leukocyte-Endothelial Cell Interactions and Blood-Brain Barrier Dysfunction under Inflammatory Conditions.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 32, no. 12 (March 21, 2012): 4004–16. doi:10.1523/JNEUROSCI.4628-11.2012.
- Rasmusson, Ida, Olle Ringdén, Berit Sundberg, and Katarina Le Blanc. “Mesenchymal Stem Cells Inhibit Lymphocyte Proliferation by Mitogens and Alloantigens by Different Mechanisms.” *Experimental Cell Research* 305, no. 1 (April 15, 2005): 33–41.

doi:10.1016/j.yexcr.2004.12.013.

- Rice, C. M., E. A. Mallam, A. L. Whone, P. Walsh, D. J. Brooks, N. Kane, S. R. Butler, D. I. Marks, and N. J. Scolding. "Safety and Feasibility of Autologous Bone Marrow Cellular Therapy in Relapsing-Progressive Multiple Sclerosis." *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 87, no. 6 (June 2010): 679–85. doi:10.1038/clpt.2010.44.
- Rivers, T. M., and F. F. Schwenker. "ENCEPHALOMYELITIS ACCOMPANIED BY MYELIN DESTRUCTION EXPERIMENTALLY PRODUCED IN MONKEYS." *The Journal of Experimental Medicine* 61, no. 5 (April 30, 1935): 689–702.
- Rivers, T. M., D. H. Sprunt, and G. P. Berry. "OBSERVATIONS ON ATTEMPTS TO PRODUCE ACUTE DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS IN MONKEYS." *The Journal of Experimental Medicine* 58, no. 1 (June 30, 1933): 39–53.
- Rizvi, Adnan Z., John R. Swain, Paige S. Davies, Alexis S. Bailey, Adria D. Decker, Holger Willenbring, Markus Grompe, William H. Fleming, and Melissa H. Wong. "Bone Marrow-Derived Cells Fuse with Normal and Transformed Intestinal Stem Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, no. 16 (April 18, 2006): 6321–25. doi:10.1073/pnas.0508593103.
- Rog, David J., Turo J. Nurmikko, Tim Friede, and Carolyn A. Young. "Randomized, Controlled Trial of Cannabis-Based Medicine in Central Pain in Multiple Sclerosis." *Neurology* 65, no. 6 (September 27, 2005): 812–19. doi:10.1212/01.wnl.0000176753.45410.8b.
- Rog, David J., Turo J. Nurmikko, and Carolyn A. Young. "Oromucosal delta9-Tetrahydrocannabinol/cannabidiol for Neuropathic Pain Associated with Multiple Sclerosis: An Uncontrolled, Open-Label, 2-Year Extension Trial." *Clinical Therapeutics* 29, no. 9 (September 2007): 2068–79. doi:10.1016/j.clinthera.2007.09.013.
- Rossi, Francesca, Maria Ester Bernardo, Giulia Bellini, Livio Luongo, Antonella Conforti, Iolanda Manzo, Francesca Guida, et al. "The Cannabinoid Receptor Type 2 as Mediator of Mesenchymal Stromal Cell Immunosuppressive Properties." *PloS One* 8, no. 11 (2013): e80022. doi:10.1371/journal.pone.0080022.
- Roth, M. P., C. Viratelle, L. Dolbois, M. Delverdier, N. Borot, L. Pelletier, P. Druet, M. Clanet, and H. Coppin. "A Genome-Wide Search Identifies Two Susceptibility Loci for Experimental Autoimmune Encephalomyelitis on Rat Chromosomes 4 and 10." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 162, no. 4 (February 15, 1999): 1917–22.
- Roufosse, C. A., N. C. Direkze, W. R. Otto, and N. A. Wright. "Circulating Mesenchymal Stem Cells." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36, no. 4 (April 2004): 585–97. doi:10.1016/j.biocel.2003.10.007.
- Rozenfeld, Raphael. "Type I Cannabinoid Receptor Trafficking: All Roads Lead to Lysosome." *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 12, no. 1 (January 2011): 12–18. doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01130.x.
- Ryberg, E., N. Larsson, S. Sjögren, S. Hjorth, N.-O. Hermansson, J. Leonova, T. Elebring, K. Nilsson, T. Drmota, and P. J. Greasley. "The Orphan Receptor GPR55 Is a Novel Cannabinoid Receptor." *British Journal of Pharmacology* 152, no. 7 (December 2007): 1092–1101. doi:10.1038/sj.bjp.0707460.
- Sadatipour, B. T., J. M. Greer, and M. P. Pender. "Increased Circulating Antiganglioside Antibodies in Primary and Secondary Progressive Multiple Sclerosis." *Annals of Neurology* 44, no. 6 (December 1998): 980–83. doi:10.1002/ana.410440621.
- Sajic, Marija, David P. J. Hunt, Woojin Lee, D. Alastair S. Compston, Judith V. Schweimer, Norman A. Gregson, Siddharthan Chandran, and Kenneth J. Smith. "Mesenchymal Stem Cells Lack Efficacy in the Treatment of Experimental Autoimmune Neuritis despite in Vitro Inhibition of T-Cell Proliferation." *PloS One* 7, no. 2 (2012): e30708. doi:10.1371/journal.pone.0030708.
- Salem, Husein K., and Chris Thiemermann. "Mesenchymal Stromal Cells: Current Understanding

- and Clinical Status.” *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 28, no. 3 (March 31, 2010): 585–96. doi:10.1002/stem.269.
- Sánchez, Antonio J., Paz González-Pérez, Ismael Galve-Roperh, and Antonio García-Merino. “R-(+)-[2,3-Dihydro-5-Methyl-3-(4-Morpholinylmethyl)-Pyrrolo-[1,2,3-De]-1,4-Benzoxazin-6-Yl]-1-Naphtalenylmethanone (WIN-2) Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Induces Encephalitogenic T Cell Apoptosis: Partial Involvement of the CB(2) Receptor.” *Biochemical Pharmacology* 72, no. 12 (December 15, 2006): 1697–1706. doi:10.1016/j.bcp.2006.08.018.
- Sánchez López, A. J., L. Román-Vega, E. Ramil Tojeiro, A. Giuffrida, and A. García-Merino. “Regulation of Cannabinoid Receptor Gene Expression and Endocannabinoid Levels in Lymphocyte Subsets by Interferon-B: A Longitudinal Study in Multiple Sclerosis Patients.” *Clinical and Experimental Immunology* 179, no. 1 (January 2015): 119–27. doi:10.1111/cei.12443.
- Sanchez-Ramos, J., S. Song, F. Cardozo-Pelaez, C. Hazzi, T. Stedeford, A. Willing, T. B. Freeman, et al. “Adult Bone Marrow Stromal Cells Differentiate into Neural Cells in Vitro.” *Experimental Neurology* 164, no. 2 (August 2000): 247–56. doi:10.1006/exnr.2000.7389.
- Schluesener, H. J., R. A. Sobel, C. Linington, and H. L. Weiner. “A Monoclonal Antibody against a Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Induces Relapses and Demyelination in Central Nervous System Autoimmune Disease.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 139, no. 12 (December 15, 1987): 4016–21.
- Schmuhl, Ellen, Robert Ramer, Achim Salamon, Kirsten Peters, and Burkhard Hinz. “Increase of Mesenchymal Stem Cell Migration by Cannabidiol via Activation of p42/44 MAPK.” *Biochemical Pharmacology* 87, no. 3 (February 1, 2014): 489–501. doi:10.1016/j.bcp.2013.11.016.
- Schurgers, Evelien, Hilde Kelchtermans, Tania Mitera, Lies Geboes, and Patrick Matthys. “Discrepancy between the in Vitro and in Vivo Effects of Murine Mesenchymal Stem Cells on T-Cell Proliferation and Collagen-Induced Arthritis.” *Arthritis Research & Therapy* 12, no. 1 (2010): R31. doi:10.1186/ar2939.
- Schwartz, Robert E., Morayma Reyes, Lisa Koodie, Yuehua Jiang, Mark Blackstad, Troy Lund, Todd Lenvik, Sandra Johnson, Wei-Shou Hu, and Catherine M. Verfaillie. “Multipotent Adult Progenitor Cells from Bone Marrow Differentiate into Functional Hepatocyte-like Cells.” *The Journal of Clinical Investigation* 109, no. 10 (May 2002): 1291–1302. doi:10.1172/JCI15182.
- Scutt, A., and E. M. Williamson. “Cannabinoids Stimulate Fibroblastic Colony Formation by Bone Marrow Cells Indirectly via CB2 Receptors.” *Calcified Tissue International* 80, no. 1 (January 2007): 50–59. doi:10.1007/s00223-006-0171-7.
- Shih, Daniel Tzu-bi, Don-Ching Lee, Shih-Chen Chen, Ren-Yeu Tsai, Chin-Ting Huang, Chia-Che Tsai, Ein-Yiao Shen, and Wen-Ta Chiu. “Isolation and Characterization of Neurogenic Mesenchymal Stem Cells in Human Scalp Tissue.” *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 23, no. 7 (August 2005): 1012–20. doi:10.1634/stemcells.2004-0125.
- Shi, Jiong, Leslie C. Baxter, and Sandra M. Kuniyoshi. “Pathologic and Imaging Correlates of Cognitive Deficits in Multiple Sclerosis: Changing the Paradigm of Diagnosis and Prognosis.” *Cognitive and Behavioral Neurology: Official Journal of the Society for Behavioral and Cognitive Neurology* 27, no. 1 (March 2014): 1–7. doi:10.1097/WNN.0000000000000023.
- Shoemaker, Jennifer L., Kathryn A. Seely, Ronald L. Reed, John P. Crow, and Paul L. Prather. “The CB2 Cannabinoid Agonist AM-1241 Prolongs Survival in a Transgenic Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis When Initiated at Symptom Onset.” *Journal of Neurochemistry* 101, no. 1 (April 2007): 87–98. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04346.x.
- Singec, Ilyas, and Evan Y. Snyder. “Inflammation as a Matchmaker: Revisiting Cell Fusion.” *Nature*

- Cell Biology* 10, no. 5 (May 2008): 503–5. doi:10.1038/ncb0508-503.
- Singer, Nora G., and Arnold I. Caplan. “Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of Inflammation.” *Annual Review of Pathology* 6 (2011): 457–78. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130230.
- Smith, Paul F. “Symptomatic Treatment of Multiple Sclerosis Using Cannabinoids: Recent Advances.” *Expert Review of Neurotherapeutics* 7, no. 9 (September 2007): 1157–63. doi:10.1586/14737175.7.9.1157.
- Spitsin, S., D. C. Hooper, T. Leist, L. J. Streletz, T. Mikheeva, and H. Koprowskil. “Inactivation of Peroxynitrite in Multiple Sclerosis Patients after Oral Administration of Inosine May Suggest Possible Approaches to Therapy of the Disease.” *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 7, no. 5 (October 2001): 313–19.
- Steinman, L. “Multiple Sclerosis: A Two-Stage Disease.” *Nature Immunology* 2, no. 9 (September 2001): 762–64. doi:10.1038/ni0901-762.
- Stepaniak, J. A., N. A. Wolf, D. Sun, and R. H. Swanborg. “Interstrain Variability of Autoimmune Encephalomyelitis in Rats: Multiple Encephalitogenic Myelin Basic Protein Epitopes for DA Rats.” *Journal of Neuroimmunology* 78, no. 1–2 (September 1997): 79–85.
- Suckling, A. J., S. Pathak, S. Jagelman, and H. E. Webb. “Virus-Associated Demyelination. A Model Using Avirulent Semliki Forest Virus Infection of Mice.” *Journal of the Neurological Sciences* 39, no. 1 (November 1978): 147–54.
- Sudres, Muriel, Françoise Norol, Aurélie Trenado, Sylvie Grégoire, Frédéric Charlotte, Béatrice Levacher, Jean-Jacques Lataillade, et al. “Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Suppress Lymphocyte Proliferation in Vitro but Fail to Prevent Graft-versus-Host Disease in Mice.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 176, no. 12 (June 15, 2006): 7761–67.
- Sun, D., J. N. Whitaker, Z. Huang, D. Liu, C. Coleclough, H. Wekerle, and C. S. Raine. “Myelin Antigen-Specific CD8+ T Cells Are Encephalitogenic and Produce Severe Disease in C57BL/6 Mice.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 166, no. 12 (June 15, 2001): 7579–87.
- Sun, Yan, and Andy Bennett. “Cannabinoids: A New Group of Agonists of PPARs.” *PPAR Research* 2007 (2007): 23513. doi:10.1155/2007/23513.
- Sun, Yong-Xin, Ai-Hua Xu, Yang Yang, Jia-Xing Zhang, and Ai-Wen Yu. “Activation of Cannabinoid Receptor 2 Enhances Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells.” *BioMed Research International* 2015 (2015): 874982. doi:10.1155/2015/874982.
- Trapp, B. D., J. Peterson, R. M. Ransohoff, R. Rudick, S. Mörk, and L. Bö. “Axonal Transection in the Lesions of Multiple Sclerosis.” *The New England Journal of Medicine* 338, no. 5 (January 29, 1998): 278–85. doi:10.1056/NEJM199801293380502.
- Traugott, U., C. S. Raine, and D. E. McFarlin. “Acute Experimental Allergic Encephalomyelitis in the Mouse: Immunopathology of the Developing Lesion.” *Cellular Immunology* 91, no. 1 (March 1985): 240–54.
- Tseng, Pang-Yen, Chun-Jung Chen, Ching-Chung Sheu, Chen-Wei Yu, and Yong-San Huang. “Spontaneous Differentiation of Adult Rat Marrow Stromal Cells in a Long-Term Culture.” *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science* 69, no. 2 (February 2007): 95–102.
- Tyndall, A., and A. Uccelli. “Multipotent Mesenchymal Stromal Cells for Autoimmune Diseases: Teaching New Dogs Old Tricks.” *Bone Marrow Transplantation* 43, no. 11 (June 2009): 821–28. doi:10.1038/bmt.2009.63.
- Uccelli, Antonio, Francesco Frassoni, and Gianluigi Mancardi. “Stem Cells for Multiple Sclerosis: Promises and Reality.” *Regenerative Medicine* 2, no. 1 (January 2007): 7–9. doi:10.2217/17460751.2.1.7.
- Uccelli, Antonio, Gianluigi Mancardi, and Sabrina Chiesa. “Is There a Role for Mesenchymal Stem Cells in Autoimmune Diseases?” *Autoimmunity* 41, no. 8 (December 2008): 592–95.

doi:10.1080/08916930802200166.

- Uccelli, Antonio, Lorenzo Moretta, and Vito Pistoia. "Immunoregulatory Function of Mesenchymal Stem Cells." *European Journal of Immunology* 36, no. 10 (October 2006): 2566–73. doi:10.1002/eji.200636416.
- Uccelli, Antonio, Vito Pistoia, and Lorenzo Moretta. "Mesenchymal Stem Cells: A New Strategy for Immunosuppression?" *Trends in Immunology* 28, no. 5 (May 2007): 219–26. doi:10.1016/j.it.2007.03.001.
- Van der Sluijs, P., M. Hull, P. Webster, P. Mâle, B. Goud, and I. Mellman. "The Small GTP-Binding Protein rab4 Controls an Early Sorting Event on the Endocytic Pathway." *Cell* 70, no. 5 (September 4, 1992): 729–40.
- Vaney, C., M. Heinzl-Gutenbrunner, P. Jobin, F. Tschopp, B. Gattlen, U. Hagen, M. Schnelle, and M. Reif. "Efficacy, Safety and Tolerability of an Orally Administered Cannabis Extract in the Treatment of Spasticity in Patients with Multiple Sclerosis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Study." *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 10, no. 4 (August 2004): 417–24.
- Van Noort, J. M., A. C. van Sechel, J. J. Bajramovic, M. el Ouagmiri, C. H. Polman, H. Lassmann, and R. Ravid. "The Small Heat-Shock Protein Alpha B-Crystallin as Candidate Autoantigen in Multiple Sclerosis." *Nature* 375, no. 6534 (June 29, 1995): 798–801. doi:10.1038/375798a0.
- Van Sickle, Marja D., Marnie Duncan, Philip J. Kingsley, Abdeslam Mouihate, Paolo Urbani, Ken Mackie, Nephi Stella, et al. "Identification and Functional Characterization of Brainstem Cannabinoid CB2 Receptors." *Science (New York, N.Y.)* 310, no. 5746 (October 14, 2005): 329–32. doi:10.1126/science.1115740.
- Viscomi, Maria Teresa, Sergio Oddi, Laura Latini, Nicoletta Pasquariello, Fulvio Florenzano, Giorgio Bernardi, Marco Molinari, and Mauro Maccarrone. "Selective CB2 Receptor Agonism Protects Central Neurons from Remote Axotomy-Induced Apoptosis through the PI3K/Akt Pathway." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29, no. 14 (April 8, 2009): 4564–70. doi:10.1523/JNEUROSCI.0786-09.2009.
- Vosoughi, Reza, and Mark S. Freedman. "Therapy of MS." *Clinical Neurology and Neurosurgery* 112, no. 5 (June 2010): 365–85. doi:10.1016/j.clineuro.2010.03.010.
- Wade, Derick. "Evaluation of the Safety and Tolerability Profile of Sativex: Is It Reassuring Enough?" *Expert Review of Neurotherapeutics* 12, no. 4 Suppl (April 2012): 9–14. doi:10.1586/ern.12.12.
- Wade, D. T., P. M. Makela, H. House, C. Bateman, and P. Robson. "Long-Term Use of a Cannabis-Based Medicine in the Treatment of Spasticity and Other Symptoms in Multiple Sclerosis." *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 12, no. 5 (October 2006): 639–45.
- Waterman, Ruth S., Suzanne L. Tomchuck, Sarah L. Henkle, and Aline M. Betancourt. "A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm: Polarization into a pro-Inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype." *PloS One* 5, no. 4 (2010): e10088. doi:10.1371/journal.pone.0010088.
- Weimann, James M., Carol A. Charlton, Timothy R. Brazelton, Robert C. Hackman, and Helen M. Blau. "Contribution of Transplanted Bone Marrow Cells to Purkinje Neurons in Human Adult Brains." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, no. 4 (February 18, 2003): 2088–93. doi:10.1073/pnas.0337659100.
- Weiner, L. P., R. T. Johnson, and R. M. Herndon. "Viral Infections and Demyelinating Diseases." *The New England Journal of Medicine* 288, no. 21 (May 24, 1973): 1103–10. doi:10.1056/NEJM197305242882106.
- Weissert, R., E. Wallström, M. K. Storch, A. Stefferl, J. Lorentzen, H. Lassmann, C. Linington, and T. Olsson. "MHC Haplotype-Dependent Regulation of MOG-Induced EAE in Rats." *The Journal of Clinical Investigation* 102, no. 6 (September 15, 1998): 1265–73.

doi:10.1172/JCI3022.

- Wekerle, H., K. Kojima, J. Lannes-Vieira, H. Lassmann, and C. Linington. "Animal Models." *Annals of Neurology* 36 Suppl (1994): S47–53.
- Wilkins, Alastair, Kevin Kemp, Mark Ginty, Kelly Hares, Elizabeth Mallam, and Neil Scolding. "Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Secrete Brain-Derived Neurotrophic Factor Which Promotes Neuronal Survival in Vitro." *Stem Cell Research* 3, no. 1 (July 2009): 63–70. doi:10.1016/j.scr.2009.02.006.
- Wislet-Gendebien, Sabine, Grégory Hans, Pierre Leprince, Jean-Michel Rigo, Gustave Moonen, and Bernard Rogister. "Plasticity of Cultured Mesenchymal Stem Cells: Switch from Nestin-Positive to Excitable Neuron-like Phenotype." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 23, no. 3 (March 2005): 392–402. doi:10.1634/stemcells.2004-0149.
- Woodbury, D., E. J. Schwarz, D. J. Prockop, and I. B. Black. "Adult Rat and Human Bone Marrow Stromal Cells Differentiate into Neurons." *Journal of Neuroscience Research* 61, no. 4 (August 15, 2000): 364–70.
- Wujek, Jerome R., Carl Bjartmar, Edward Richer, Richard M. Ransohoff, Min Yu, Vincent K. Tuohy, and Bruce D. Trapp. "Axon Loss in the Spinal Cord Determines Permanent Neurological Disability in an Animal Model of Multiple Sclerosis." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 61, no. 1 (January 2002): 23–32.
- Yamada, Yoichi, Atsushi Fujimoto, Akira Ito, Ryoko Yoshimi, and Minoru Ueda. "Cluster Analysis and Gene Expression Profiles: A cDNA Microarray System-Based Comparison between Human Dental Pulp Stem Cells (hDPSCs) and Human Mesenchymal Stem Cells (hMSCs) for Tissue Engineering Cell Therapy." *Biomaterials* 27, no. 20 (July 2006): 3766–81. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.02.009.
- Yamout, Bassem, Roula Hourani, Haytham Salti, Wissam Barada, Taghrid El-Hajj, Aghiad Al-Kutoubi, Aline Herlopian, et al. "Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Patients with Multiple Sclerosis: A Pilot Study." *Journal of Neuroimmunology* 227, no. 1–2 (October 8, 2010): 185–89. doi:10.1016/j.jneuroim.2010.07.013.
- Yousefi, Forouzan, Massoumeh Ebtekar, Masoud Soleimani, Sara Soudi, and Seyed Mahmoud Hashemi. "Comparison of in Vivo Immunomodulatory Effects of Intravenous and Intraperitoneal Administration of Adipose-Tissue Mesenchymal Stem Cells in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE)." *International Immunopharmacology* 17, no. 3 (November 2013): 608–16. doi:10.1016/j.intimp.2013.07.016.
- Zafranskaya, Marina M., Darya B. Nizheharodova, Mariya Yu Yurkevich, Natallia V. Lamouskaya, Yana M. Motuzova, Svetlana S. Bagatka, Halina I. Ivanchik, and Alexander S. Fedulov. "In Vitro Assessment of Mesenchymal Stem Cells Immunosuppressive Potential in Multiple Sclerosis Patients." *Immunology Letters* 149, no. 1–2 (January 2013): 9–18. doi:10.1016/j.imlet.2012.10.010.
- Zajicek, John, Patrick Fox, Hilary Sanders, David Wright, Jane Vickery, Andrew Nunn, Alan Thompson, and UK MS Research Group. "Cannabinoids for Treatment of Spasticity and Other Symptoms Related to Multiple Sclerosis (CAMS Study): Multicentre Randomised Placebo-Controlled Trial." *Lancet (London, England)* 362, no. 9395 (November 8, 2003): 1517–26. doi:10.1016/S0140-6736(03)14738-1.
- Zajicek, J. P., H. P. Sanders, D. E. Wright, P. J. Vickery, W. M. Ingram, S. M. Reilly, A. J. Nunn, L. J. Teare, P. J. Fox, and A. J. Thompson. "Cannabinoids in Multiple Sclerosis (CAMS) Study: Safety and Efficacy Data for 12 Months Follow up." *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 76, no. 12 (December 2005): 1664–69. doi:10.1136/jnnp.2005.070136.
- Zamvil, S. S., and L. Steinman. "The T Lymphocyte in Experimental Allergic Encephalomyelitis." *Annual Review of Immunology* 8 (1990): 579–621. doi:10.1146/annurev.iy.08.040190.003051.
- Zappia, Emanuela, Simona Casazza, Enrico Pedemonte, Federica Benvenuto, Ivan Bonanni, Ezio

- Gerdoni, Debora Giunti, et al. "Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Inducing T-Cell Anergy." *Blood* 106, no. 5 (September 1, 2005): 1755–61. doi:10.1182/blood-2005-04-1496.
- Zhang, Wen-jie, and Yi-lin Cao. "[Stem cell, the basis for tissue and organ reconstruction]." *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. Acta Academiae Medicinae Sinicae* 27, no. 6 (December 2005): 662–64.
- Zivadinov, R., M. G. Dwyer, S. Hussein, E. Carl, C. Kennedy, M. Andrews, D. Hojnacki, et al. "Voxel-Wise Magnetization Transfer Imaging Study of Effects of Natalizumab and IFN β -1a in Multiple Sclerosis." *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 18, no. 8 (August 2012): 1125–34. doi:10.1177/1352458511433304.